

**İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ 1 İZOENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Oya BÜYÜKEMİR

Eskişehir 2019

**İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ 1 İZOENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Oya BÜYÜKEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mayıs 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Oya BÜYÜKEMİR'in "İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ 1 İZOENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tezi 02/05/2019 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 BEYDEM	
Üye	: Prof. Dr. Zerrin SELLER	
Üye	: Prof. Dr. Tamer AKAR	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN
Enstitü Müdürü



ÖZET

İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ 1 İZOENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Oya BÜYÜKEMİR

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2019

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Paraoksonaz 1 (E.C.3.1.8.1; PON1) metabolizmada önemli bir organofosfat hidrolizleyicisi olarak görev yapan ve yapısında 2 adet Ca^{2+} bulunduran HDL bağımlı bir metaloenzimdir. Enzim HDL'yi oksidasyondan koruduğu gibi LDL'yi de koruyarak aterosklerotik lezyonların oluşumunu engelleyen hayati bir öneme sahiptir.

Tez çalışması kapsamında *Crataegus tanacetifolia*, *Rumex acetosella*, *Thymus sibthorpii* ve *Asphodeline taurica* bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin antioksidan özellikleri belirlendi. Bitki ekstrelerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek için; demir indirgeme, FRAP, CUPRAC, ABTS, DPPH, DMPD, bipiridil, süperoksit anyon radikali giderme, total fenolik bileşik miktar tayini ve total antioksidan aktivite tayini yöntemleri uygulandı. Aynı zamanda LC/MS-IT-TOF yöntemiyle bitki ekstrelerinin moleküler içeriği tespit edilerek belirlenen etken maddelerle PON1 izoenziminin muhtemel etkileşimleri *in silico* çalışmalar ile gösterildi. Daha sonra PON1 izoenzimi, insan serumundan sırasıyla, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak %5,49 verimle saflaştırıldı. Saflaştırma katsayısı yaklaşık 79,54 ve spesifik aktivitesi 2612,22 EU/mg protein olarak hesaplandı. PON1 izoenziminin saflığı SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edilerek alt birim molekül kütlesi 43 kDa olarak belirlendi. Bitki ekstrelerinin enzimin paraoksonaz aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri Aktivite (%) – [Ekstre] grafiklerinde gösterildi. En yüksek aktivite değerini *Rumex acetosella* bitkisinin etanollü ekstresi, en düşük aktivite değerini ise *Asphodeline taurica*'nın sulu ekstresi gösterdi. Son olarak kullandığımız bitki ekstrelerinin mitokondriyal aktivite testi (MTT) ile sitotoksosite düzeyleri hesaplandı.

Anahtar Sözcükler: Paraoksonaz 1, Enzim saflaştırma, Enzim aktivitesi, Docking, Antioksidan aktivite, MTT

ABSTRACT

PURIFICATION OF PARAOXONASE 1 ISOENZYME FROM HUMAN SERUM AND INVESTIGATION EFFECTS OF SOME PLANT EXTRACT ON ENZYME ACTIVITY

Oya BÜYÜKEMİR

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May 2019

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Paraoxonase 1 (E.C.3.1.8.1; PON1) is a Ca^{2+} -studded HDL dependant metalloenzyme that acting as a crucial organophosphate hydrolyzer in metabolism. Enzyme prevents HDL from oxidation. Moreover, enzyme protects LDL and has a vital role of inhibition of atherosclerosis lesions.

As a part of thesis, antioxidant activity of extracts from *Crataegus tanacetifolia*, *Rumex acetosella*, *Thymus sibthorpii* ve *Asphodeline taurica* were determined via ferrous reduction, FRAP, CUPRAC, ABTS, DPPH, DMPD, bipyridyl, superoxide anion radical scavenging, total phenolic compounds and total antioxidant activity methods. Then, major compounds of plant extracts were identified via LC/MS-IT-TOF and possible interactions with PON1 isoenzyme were demonstrated *in silico* studies. Furthermore, PON1 isoenzyme was purified with 5.49% yield from human serum using a method in order to ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange and Sephadex G-100 gel filtration chromatography. Purification factor and specific activity were calculated as 79.54 and 2612.22 EU/mg protein, respectively. Purity of PON1 isoenzyme was tested using SDS-PAGE and also subunit molecular weight was determined as 43 kDa. *In vitro* effects of extracts to paraoxonase activity was presented in Activity (%) – [Extract] graphs. The highest activity value was attained from ethanol extract of *Rumex acetosella*, and on the contrary the lowest activity value from aqueous extract of *Asphodeline taurica*. In conclusion, cytotoxicity of extracts was investigated with Mitochondrial Activity Test (MTT).

Keywords: Paraoxonase 1, Enzyme purification, enzyme activity, docking, antioxidant activity, MTT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgisini, yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, gerekli imkanları sağlayarak tecrübelerini paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Yüksek lisans çalışmalarımın tümünü birlikte yürüttüğüm, büyük bir özveri ile yanımda olan ve çalışmalarda en az benim kadar emek harcıyıp, katkı sağlayan değerli dostum Uzm. Kimyager Deniz NEZİR'e,

Eğitimim süresince emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanıp kendisini örnek aldığım 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, Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN, Doç Dr. Mehlika Dilek ALTINTOP ve Dr. Öğr. Gör. Cüneyt TÜRKEŞ'e,

Çalışmama katkılarını sunan değerli arkadaşlarım, Dr. Öğr. Gör. Yeliz DEMİR, Dr. Öğr. Gör. Hülya Tuba KIYAN, Arş. Gör. Dr. Belgin SEVER, Arş. Gör. Ceren ELİBOL İLERİ, Arş. Gör. Onur İLERİ, Uzm. Kimyager Murat KOZANLI, Uzm. Biyolog Emre ODUNCU, Uzm. Biyolog Arda SEVER, Uzm. Ecz. Asaf Evrim EVREN ve Ecz. Aysun GEVEN'e,

Tez çalışmalarım süresince makine teçhizat ve sarf malzemesi ihtiyaçları için destek aldığım 1610S681 ve 1805S210 no'lu BAP projelerine,

Bu süreçte bana her konuda destek veren, sabır ve anlayış gösteren, bilgi birikiminden faydalandığım yol arkadaşım Kimyager Cihan İKİZ'e,

Sadece tez çalışmalarımda değil hayatımın her anında yanımda olan, sevgilerini ve güvenlerini her an hissettiğim canım aileme; annem Nimet BÜYÜKEMİR, babam Mustafa BÜYÜKEMİR ve abim Orçun BÜYÜKEMİR'e teşekkür ederim.

02/05/2019

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.

Oya BÜYÜKEMİR

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. Enzimlerin sınıflandırılması.....	3
1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler	5
1.1.3. Enzim inhibisyonu	6
1.2. Paraoksonaz.....	9
1.2.1. PON1	10
1.2.2. PON2	29
1.2.3. PON3	29
1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	30
1.3.1. Serbest radikallerin çeşitli kaynakları	34
1.3.2. Serbest radikallerle biyomoleküllerin hasarı	36
1.3.3. Serbest radikallerin fizyolojik rolü	38
1.4. Antioksidanlar	39
1.4.1. Vücudun antioksidan savunması.....	39
1.5. Bitkiler.....	42
1.5.1. Kotan alıcı (<i>Crataegus tanacetifolia</i>).....	43

1.5.1.1. Bitkinin genel özellikleri	43
1.5.1.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması	44
1.5.2. Kuzukulağı (<i>Rumex acetosella</i>)	45
1.5.2.1. Bitkinin genel özellikleri	45
1.5.2.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması	46
1.5.3. Top kekik (<i>Thymus sibthorpii</i>)	47
1.5.3.1. Bitkinin genel özellikleri	47
1.5.3.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması	48
1.5.4. Çiriş otu (<i>Asphodeline taurica</i>).....	49
1.5.4.1. Bitkinin genel özellikleri	49
1.5.4.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması	50
1.6. Çalışmanın Amacı	51
2. KAYNAK BİLGİSİ	53
3. GEREÇLER	60
3.1. Kullanılan Maddeler	60
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	63
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	64
3.3.1. Aktivite ölçümü için kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	64
3.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesinde ve diyalizde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	64
3.3.3. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	64
3.3.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	65
3.3.5. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	65
3.3.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılan çözeltilerin ve jellerin hazırlanması	66

3.3.7. Bitki ekstralarının stok çözeltilerinin hazırlanması	68
3.3.8. Antioksidan aktivite tayinlerinde yöntemlere göre kullanılan çözeltilerin hazırlanması	68
4. YÖNTEMLER	73
4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	73
4.2. Bitki Ekstrelerinin LC/MS-IT-TOF Cihazı ile İçerik Analizi	73
4.3. Moleküler Modelleme (Docking) Çalışmaları	73
4.4. İnsan Serumu Temini	74
4.5. İnsan Serum PON1 Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi	74
4.6. İnsan Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Çalışmalar	74
4.7. Protein Tayini ile İlgili Çalışmalar	79
4.8. SDS-PAGE ile PON1 Enzim Saflığının Kontrolü	80
4.9. İnsan Serumundan Saflaştırılan PON1 İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkisinin İncelenmesi	81
4.10. Kullanılan Bitkilerin Antioksidan Kapasite Tayinlerinin Belirlenmesi ..	82
4.10.1. Demir indirgeme kuvveti tayini (Fe^{+3} - Fe^{+2})	82
4.10.2. FRAP metodu	82
4.10.3. CUPRAC metodu	83
4.10.4. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini	83
4.10.5. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini	83
4.10.6. DMPD radikali (DMPD^{+}) giderme aktivitesi tayini	84
4.10.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	84
4.10.8. Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi tayini	84
4.10.9. Total fenolik bileşik miktar tayini	85
4.10.10. Total antioksidan aktivite tayini	85
4.11. MTT Sitotoksikite Testi	86
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR	87

5.1. LC/MS-IT-TOF	87
5.1.1. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin içerik analizi.....	88
5.1.2. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin içerik analizi	90
5.1.3. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin içerik analizi	92
5.1.4. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin içerik analizi	94
5.2. Moleküler Modelleme (Docking) Bulguları	96
5.2.1. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları	96
5.2.2. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları	98
5.2.3. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları .	100
5.2.4. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin etanol ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları .	102
5.2.5. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları .	104
5.2.6. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları	106
5.2.7. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları .	108
5.2.8. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları	110
5.3. PON1 Enziminin Saflaştırma Sonuçları	112
5.3.1. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi sonuçları.....	112
5.3.2. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi sonuçları.....	113

5.3.3. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	115
5.3.4. SDS –Poliakrilamid jel elektroforezi ile PON1 enziminin saflığının kontrolü	116
5.4. İnsan Serum PON1 İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin İncelenmesi Sonuçları.....	117
5.4.1. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Crataegus</i> <i>tanacetifolia</i> ekstrelerinin etkileri	117
5.4.2. <i>Rumex acetosella</i> ekstrelerinin PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri	118
5.4.3. <i>Thymus sibthorpii</i> ekstrelerinin PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri	119
5.4.4. <i>Asphodeline taurica</i> ekstrelerinin PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri	120
5.5. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	121
5.5.1. Demir indirgeme kuvveti tayini ($Fe^{+3}-Fe^{+2}$).....	121
5.5.2. FRAP metodu	124
5.5.3. CUPRAC metodu	127
5.5.4. ABTS radikali ($ABTS^{+}$) giderme aktivitesi tayini.....	130
5.5.5. DPPH serbest radikal ($DPPH^{\bullet}$) giderme aktivitesi tayini	134
5.5.6. DMPD radikali ($DMPD^{+}$) giderme aktivitesi tayini.....	138
5.5.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	142
5.5.8. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivitesi tayini.....	145
5.5.9. Total fenolik bileşik miktar tayini	148
5.5.10. Total antioksidan aktivite tayini.....	149
5.6. MTT Sitotoksosite Testi	152
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	153
KAYNAKÇA.....	160
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Bazı enzimlerin turnover sayıları	1
Tablo 1.2. PON1, PON2 ve PON3'ün biyolojik rolleri	24
Tablo 1.3. PON1, PON2 ve PON3'ün normal hücrelerdeki biyolojik rolleri	28
Tablo 1.4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri	31
Tablo 1.5. Oksidanlar ve genel özelliklerinin özeti	33
Tablo 1.6. Serbest radikallerin endojen kaynakları.....	34
Tablo 1.7. Dış kaynaklı oksidatif stres kaynakları	35
Tablo 1.8. Oksidatif stres oluşturabilecek ilaçlar	36
Tablo 1.9. Antioksidanların sınıflandırılması	40
Tablo 1.10. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması	43
Tablo 1.11. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması	45
Tablo 1.12. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması	47
Tablo 1.13. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması.....	49
Tablo 4.1. PON1 enziminin aktivite ölçüm tablosu.....	82
Tablo 5.1. İnsan serum PON1 enziminin saflaştırma tablosu.....	114
Tablo 5.2. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının r^2 ve aktivite (%) değerleri.....	117
Tablo 5.3. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının r^2 ve aktivite (%) değerleri.....	118
Tablo 5.4. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının r^2 ve aktivite (%) değerleri.....	119
Tablo 5.5. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının r^2 ve aktivite (%) değerleri.....	120
Tablo 5.6. Bitki ekstraktlarının gallik asit'e eşdeğer total fenolik bileşik miktarları....	148
Tablo 5.7. MTT sonuçları	152
Tablo 6.1. PON1 izoenziminin saflaştırılmasının ve aktivite çalışmalarının toplu verileri	157
Tablo 6.2. PON1 izoenziminin docking çalışmaları için toplu veriler	158
Tablo 6.3. Antioksidan deneylerinin toplu verileri	159

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli.....	2
Şekil 1.2. İndüklenmiş uyum modeli.....	2
Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyon grafiği.....	7
Şekil 1.4. Yarışmasız inhibisyon grafiği	8
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği	9
Şekil 1.6. PON gen kümesi için genetik harita	10
Şekil 1.7. PON1'in genel yapısının yukarıdan görünümü	11
Şekil 1.8. PON1 enziminin üç boyutlu yapısı	12
Şekil 1.9. PON1 gen polimorfizmleri	13
Şekil 1.10. PON1'in aktif bölgesinde bulunan amino asitler ve iyonlar	15
Şekil 1.11. Paraoksonazın katalitik mekanizması (fenilasetat ve naftilasetat gibi substratların PON1 enzimi tarafından hidrolizi)	16
Şekil 1.12. Yaygın olarak kullanılan insektisitlerin okson metabolitlerinin PON1 ile hidrolizi	19
Şekil 1.13. Kimyasal savaş ajanlarının PON1 ile hidrolizi (sinir gazları).....	20
Şekil 1.14. Aromatik esterlerin PON1 ile hidrolizi	21
Şekil 1.15. Laktonların PON1 ile hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonizasyonu....	21
Şekil 1.16. İnsan PON gen ailesinin doku dağılımı.....	30
Şekil 1.17. Moleküler oksijenin dört ve bir elektron şemaları ile azaltılması	32
Şekil 1.18. Vücutta oluşan ROS ve RNS türlerinin verdiği hasarların basit mekanizması	38
Şekil 1.19. Serbest radikallerin nötralize edilmesinde insan vücudundaki çeşitli antioksidanların etkinliği	40
Şekil 1.20. Antioksidanların reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizması	41
Şekil 1.21. Bitkilerin toplandığı yer	42
Şekil 1.22. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisi	44
Şekil 1.23. <i>Rumex acetosella</i> bitkisi	46
Şekil 1.24. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisi	48
Şekil 1.25. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisi	50

Şekil 4.1. Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu (solda) ve DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonu (sağda)	79
Şekil 5.1. <i>Crataegus tanacetifolia</i> sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları.....	88
Şekil 5.2. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Crataegus tanacetifolia</i> sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	88
Şekil 5.3. <i>Crataegus tanacetifolia</i> etanollü ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları	89
Şekil 5.4. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Crataegus tanacetifolia</i> etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	89
Şekil 5.5. <i>Rumex acetosella</i> sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları	90
Şekil 5.6. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Rumex acetosella</i> sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	90
Şekil 5.7. <i>Rumex acetosella</i> etanollü ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları	91
Şekil 5.8. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Rumex acetosella</i> etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	91
Şekil 5.9. <i>Thymus sibthorpii</i> sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları.....	92
Şekil 5.10. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Thymus sibthorpii</i> sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	92
Şekil 5.11. <i>Thymus sibthorpii</i> etanollü ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları	93
Şekil 5.12. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Thymus sibthorpii</i> etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	94
Şekil 5.13. <i>Asphodeline taurica</i> sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları	94
Şekil 5.14. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Asphodeline taurica</i> sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	94
Şekil 5.15. <i>Asphodeline taurica</i> etanollü ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları .	95
Şekil 5.16. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu <i>Asphodeline taurica</i> etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	95
Şekil 5.17. A: Maslinik asit, B: Kateşin ve C: 6-Metoksi apigenin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi	97
Şekil 5.18. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Maslinik asit, B: Kateşin ve C: 6-Metoksi apigenin bileşiklerinin etkileşimi.....	97

Şekil 5.19. A: Hiperozid ve B: Kuersetin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	98
Şekil 5.20. <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin etanol ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Hiperozid ve B: Kuersetin bileşiklerinin etkileşimi.....	99
Şekil 5.21. A: Ferulik asit ve B: Kurkumin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	100
Şekil 5.22. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Ferulik asit ve B: Kurkumin bileşiklerinin etkileşimi.....	101
Şekil 5.23. A: Kafeik asit-3-glukozid, B: Orientin ve C: Kurkumin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi	102
Şekil 5.24. <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin etanol ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit-3-glukozid, B: Orientin ve C: Kurkumin bileşiklerinin etkileşimi.....	103
Şekil 5.25. A: Kafeik asit etil ester, B: Prephenik asit ve C: Ekonazol bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	104
Şekil 5.26. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit etil ester, B: Prephenik asit ve C: Ekonazol bileşiklerinin etkileşimi.....	105
Şekil 5.27. A: Eriodiktol-7-o-glukuronid ve B: Luteolin-7-glukozid bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	106
Şekil 5.28. <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Eriodiktol-7-o-glukuronid ve B: Luteolin-7-glukozid bileşiklerinin etkileşimi.....	107
Şekil 5.29. A: Metil kafeik asit, B: Ekonazol ve C: Geraniloksiemodin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	108

Şekil 5.30. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Metil kafeik asit, B: Ekonazol ve C: Geraniloksiemodin bileşiklerinin etkileşimi.....	109
Şekil 5.31. A: Kafeik asit-3-sülfat, B: p-Kumarik asit ve C: 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakınon bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi.....	110
Şekil 5.32. <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin etanollü ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit-3-sülfat, B: p-Kumarik asit ve C: 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakınon bileşiklerinin etkileşimi.....	111
Şekil 5.33. PON1 enziminin DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi aktivite grafiği	112
Şekil 5.34. PON1 enziminin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi aktivite/absorbans grafiği.....	113
Şekil 5.35. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılır BSA standart grafiği.....	115
Şekil 5.36. PON1 enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	116
Şekil 5.37. PON1 enziminin SDS-PAGE üç boyutlu fotoğrafı.....	116
Şekil 5.38. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Crataegus tanacetifolia</i> bitkisinin su ve etanol ekstralarının etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği.....	117
Şekil 5.39. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Rumex acetosella</i> bitkisinin su ve etanol ekstralarının etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği.....	118
Şekil 5.40. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Thymus sibthorpii</i> bitkisinin su ve etanol ekstralarının etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği.....	119

Şekil 5.41. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine <i>Asphodeline taurica</i> bitkisinin su ve etanol ekstralarının etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği.....	120
Şekil 5.42. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının Fe ³⁺ iyonlarını Fe ²⁺ iyonlarına indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	121
Şekil 5.43. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının Fe ³⁺ iyonlarını Fe ²⁺ iyonlarına indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	122
Şekil 5.44. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	123
Şekil 5.45. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	123
Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe ³⁺), ferröz (Fe ²⁺) iyonlarına indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	124
Şekil 5.47. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe ³⁺), ferröz (Fe ²⁺) iyonlarına indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	125
Şekil 5.48. FRAP reaktifi ile sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarını (Fe ³⁺), ferröz (Fe ²⁺) iyonlarına indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	126
Şekil 5.49. FRAP reaktifi ile etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarını (Fe ³⁺), ferröz	

(Fe ²⁺) iyonlarına indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	126
Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	127
Şekil 5.51. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	128
Şekil 5.52. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	129
Şekil 5.53. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	129
Şekil 5.54. ABTS serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart ABTS ^{•+} grafiği.....	130
Şekil 5.55. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının ABTS radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	131
Şekil 5.56. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının ABTS radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	132
Şekil 5.57. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	133
Şekil 5.58. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	133

Şekil 5.59. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DPPH $\cdot$ grafiği.....	134
Şekil 5.60. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) sulu bitki ekstralarının DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması	135
Şekil 5.61. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) etanollü bitki ekstralarının DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması	136
Şekil 5.62. Sulu bitki ekstralarının 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	137
Şekil 5.63. Etanollü bitki ekstralarının 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	137
Şekil 5.64. DMPD serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DMPD $^{+}$ grafiği.....	138
Şekil 5.65. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) sulu bitki ekstralarının DMPD serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması	139
Şekil 5.66. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) etanollü bitki ekstralarının DMPD serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması	140
Şekil 5.67. Sulu bitki ekstralarının 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	141
Şekil 5.68. Etanollü bitki ekstralarının 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	141

Şekil 5.69. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstrlerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	142
Şekil 5.70. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstrlerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	143
Şekil 5.71. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması	144
Şekil 5.72. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması	144
Şekil 5.73. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstrlerinin süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	145
Şekil 5.74. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstrlerinin süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	146
Şekil 5.75. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali (O ₂ ^{·-}) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması.....	147
Şekil 5.76. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali (O ₂ ^{·-}) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması.....	147
Şekil 5.77. Gallik asit standart grafiği	148
Şekil 5.78. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen sulu ekstrlerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	149

Şekil 5.79. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen sulu ekstrelerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks ve α- Tokoferol ile karşılaştırılması	150
Şekil 5.80. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan sulu ekstrelerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması.....	150
Şekil 5.81. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan etanollü ekstrelerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması	151

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS^{•+}	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
AChE	: Asetilkolinesteraz
Apo A1	: Apolipoprotein
ATP	: Adenozin trifosfat
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
BSA	: Sığır serum albümin
C	: Sistein
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DEP	: Dietil fosfat
DMPD	: N, N'-Dimetil-fenilendiamin
DMPD^{•+}	: N, N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH[•]	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
E	: Enzim
E-	: Negatif iyon modu
E.C.	: Enzim kod numarası
E+	: Pozitif iyon modu
EÜ	: Enzim ünitesi
ES	: Enzim-substrat
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
I	: İnhibitör
IC₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
K_m	: Maksimum hızı yarıya düşüren substrat konsantrasyonu
KKH	: Koroner kalp hastalığı

LCAT	: Lesitin kolesterol açıl transferaz
LC/MS-IT-TOF	: Sıvı kromatografi – kütle spektrometri sistemi
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
L	: Lösün
LOO•	: Lipit peroksit radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
M	: Metiyonin
MHP	: Metil pirimidinol
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
O₂⁻	: Süperoksit anyon radikali
OP	: Organofosfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
PNP	: Para-nitrofenol
PON	: Paraoksonaz
Q	: Glutamin
R	: Arginin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
S	: Substrat
SDH	: Süksinat dehidrohenaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TCA	: Triklorasetik asit
TCP	: Trikloropiridinol
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

Son yıllarda çeşitli kaynaklardan saflaştırılan ve kristal yapıları incelenen enzimlerin sayısı 200'ü geçmesine rağmen toplamda 2000 kadar enzimin varlığı tanımlanmıştır. Devam eden çalışmalar henüz tespit edilmeyen birçok enzimin varlığına işaret etmektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda çoğu enzimin yapısı ve kimyasal mekanizması aydınlatılmış, aynı zamanda kinetikleri ortaya konulmuştur [1, 2].

Enzimler, canlıların hücrelerinde sentezlenerek, canlı bünyesindeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 verimle ürün oluşumunu sağlayan, katalitik aktiviteye sahip RNA moleküllerinin bir bölümü hariç çoğunluğu protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir [1].

Enzim katalizli reaksiyonların katalize edilmemiş reaksiyonlardan 10^3 - 10^8 kat daha hızlı ilerledikleri bilinmektedir. Saniyede enzim molekülü başına ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısına turnover sayısı denir. Enzimler birbirine benzer yapıdaki substratlar arasında bile ayırım yapabilen spesifik moleküller oldukları için “olağanüstü katalizörler” olarak nitelendirilirler [2, 3].

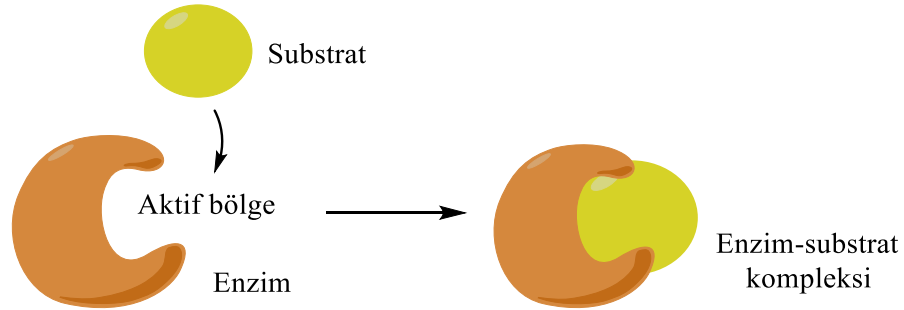
Tablo 1.1. Bazı enzimlerin turnover sayıları [1]

Enzim	Substrat	Turnover sayısı (s^{-1})
Katalaz	H_2O_2	40 000 000
Karbonik anhidraz	HCO_3^-	600 000
Asetilkolin esterase	Asetilkolin	140 000
β -laktamaz	Benzilpenisilin	2 000
Fumaraz	Fumarat	800

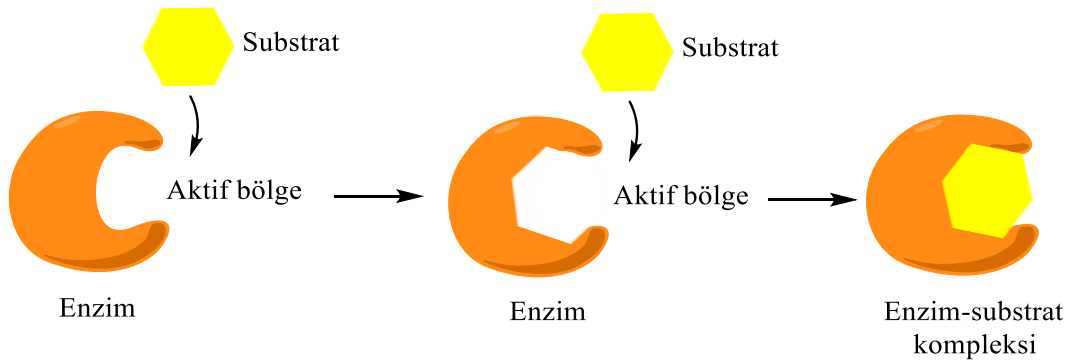
Enzimler çeşitli şekillerde denatüre edildiklerinde katalitik aktivitelerini kaybederler. Dolayısıyla, enzimlerin primer, sekonder, tersiyer ve quarterner yapıları katalitik aktivite göstermeleri için esastır. Enzim molekülleri aktif bölge denilen özel bölgeye sahiptir. Aktif bölgeye kovalent bağlardan daha zayıf bağ ile bağlanan ve enzimin üzerinde fonksiyon gösterdiği moleküle substrat denir. Substrat ile enzim etkileşince enzim-substart (ES) kompleksi meydana gelir. ES ise enzim ve ürüne parçalanmadan önce enzim-ürün (EÜ) geçiş kompleksine dönüşür [1-3].



Enzim-substrat bağlanmalarında anahtar kilit modeli ve indüklenmiş uyum modeli olmak üzere iki model ileri sürülmüştür. Anahtar kilit modelinde anahtarın kilide uyması gibi, substrat molekülünün enzimin aktif bölgesine bağlanması göz önüne alınır. İndüklenmiş uyum modelinde, anahtar kilit modelindeki sınırlama daha farklıdır. Bu modelde, substrat hala bir anahtar gibi enzime uymak zorundadır. Ancak basitçe kilide takılmak yerine, substratta, enzimde veya her ikisinde bir tür modifikasyon meydana gelir. Böylece reaksiyon süreci başlar [4].



Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli [4]



Şekil 1.2. İndüklenmiş uyum modeli [4]

Enzimlerin bazıları katalitik aktivite göstermek için ek bir kimyasal gruba ihtiyaç duymazken, bazıları kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Kofaktör; Zn^{2+} , Fe^{2+} ve Mg^{2+} gibi metal iyonları olduğu gibi koenzim olarak bilinen flavin adenin dinükleotid (FAD), nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) gibi organik moleküller de olabilir. Bazı durumlarda aktivite gözlenmesi için her ikisi de gereklidir. Kofaktörü ile birlikte aktif olan enzim holoenzim,

holoenzimin protein kısmı apoenzim olarak tanımlanır. Enzimin üç boyutlu yapısına sıkı bir şekilde kovalent olarak bağlı olup enzim yapısından diyalizle ayrılmayan kofaktörlere prostetik grup, gevşek bir şekilde bağlı olup ayrılabilenlere ise prostetik olmayan grup adı verilir [1, 3].

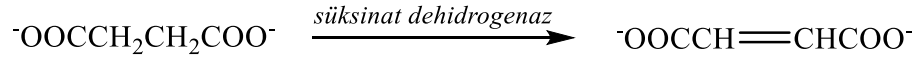
1.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Hangi dile veya ilgi alanına dahil olursa olsun, bir şeyin isimlendirilmesi anlaşılması için gereklidir. Bu durum hayatın her alanında geçerli olduğu gibi enzimler için de geçerlidir [5].

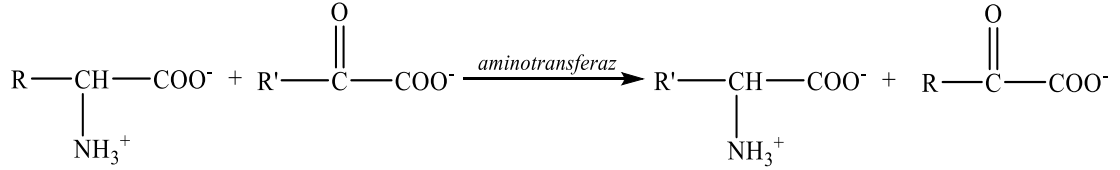
Enzimler ilk olarak, kataliz ettikleri reaksiyonların ya da substratlarının sonuna “az” ekinin ilave edilmesiyle isimlendirilmiştir. Deoksiribo nükleik asiti (DNA) oluşturmak için nükleotitlerin polimerleşmesini sağlayan DNA polimeraz enzimi, üreyi CO_2 ve NH_3 'e dönüştüren üreaz enzimi bu tip isimlendirmeye örnektir. Ancak bir diğer isimlendirme yöntemi olarak kullanılan ve enzimin sonuna “in” ekinin getirilmesiyle adlandırılan pepsin, tripsin gibi enzimler substratları ile ilgili bilgi vermezler [1, 2].

Yapılan bilimsel çalışmaların sonuçları ve mevcut isimlendirme yöntemlerinin yetersizlikleri nedeniyle, enzimlerin isimleri Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından, bir Enzim Komisyon (E.C.) numarası ile sistematik olarak tanımlanmıştır. Daha sonra, çalışmalar Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) adı altında devam etse de orijinal sınıflandırma korunmuştur. Buna göre E.C. numarası, substratların ürünlere dönüşümüne bağlı olarak enzimleri sınıflandırmak için kullanılan dört seviyeli bir tanımlamadır [5, 6]. İlk rakam altı ana enzim grubundan hangisi olduğunu, ikinci rakam etkilenen alt grubu, üçüncü rakam alt grupların kendilerini tanımlama şekline benzer şekilde alt alt grupları, dördüncü rakam ise aynı başlangıçlara sahip enzimin gruptaki sırasını temsil eder [6]. Enzim sınıflandırmasında ilk rakamın temsil ettiği altı ana enzim grubu şunlardır:

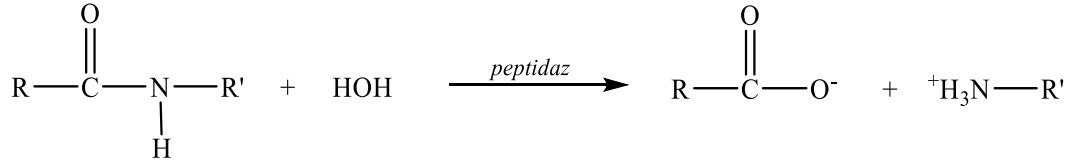
1-Oksidoredüktazlar: Redoks (oksidasyon-redüksiyon) tepkimelerini katalizleme özelliğine sahip enzim grubudur. Oksidazlar ve redüktazlar örnek verilebilir. Süksinat dehidrogenaz, süksinat iyonunun oksidasyonunu katalize eder. Oksidasyon, bir trans çift bağının oluşumu ile iki hidrojen atomunun kaybını içerir. Alkol dehidrogenaz, bir aldehit üretmek için iki hidrojen atomunu bir alkolden çıkarır [4].



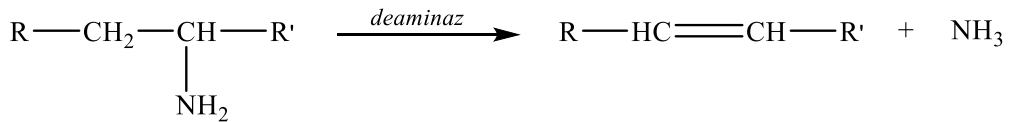
2-Transferazlar: Hidrojen dışındaki bir grubun, bir molekülden diğerine transferini katalize eden enzimlerdir. Aminotransferaz bir amino grubunu, fosfotransferaz ise bir fosforil grubunu transfer edebilir [1, 4].



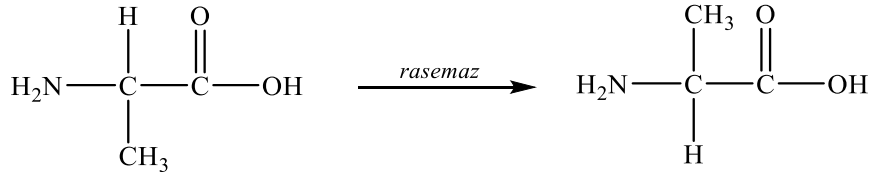
3-Hidrolazlar: Hidrolazlar, su molekülü kullanarak bir bağın hidrolozini katalize eden enzimlerdir. Fosfataz, bir monofosfat esterinin hidrolizini, peptidaz da bir peptit bağının hidrolizini katalize edebilir [4].



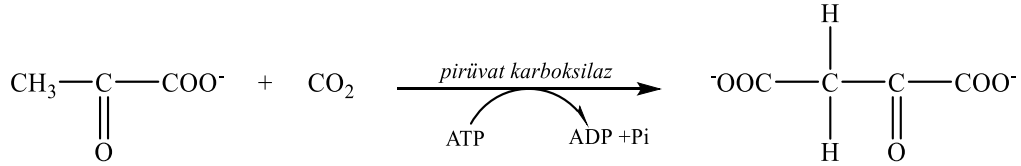
4-Liyazlar: Liyazlar, hidrolizden farklı bir yolla, substratlardan bir grubun (C-N, C-O ve C-C) çıkarılmasını katalize eder. Bu sürece bir çift bağın oluşturulması eşlik eder. Örneğin; Deaminaz, amonyak giderilmesine yardımcı olurken, dekarboksilaz ise CO₂ kaybını katalizleyebilir [1, 4].



5-İzomerazlar: İzomeraz enzimleri, optik ve yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalize eden enzimlerdir. Rasemaz ve epimeraz örnek olarak verilebilir [4].



6-Ligazlar: Ligaz enzimleri, iki molekül arasında bir kovalent bağın oluştuğu, yani iki molekülün birleşmesine yol açan reaksiyonu katalize eder. Bu süreç genellikle ATP'nin ADP'ye dönüşmesiyle ortaya çıkan yüksek enerjiyi kullanır. Piruvat karboksilaz bir C-C bağının oluşumunu katalizler. Asetil-CoA sentaz, bir C-S bağının oluşumunu katalizler [2, 4].



1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzimler hücrelerden izole edilerek, özellikleri laboratuvar ortamında *in vitro* olarak incelenebilir. Farklı enzimler, substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'daki değişimlere aynı tepkiyi vermeyebilirler. Bu faktörlerdeki değişimlere verilen enzimatik yanıtlar, enzimlerin canlı hücrelerde *in vivo* koşullarda nasıl fonksiyon gördükleri hakkında bilgi verir. Ayrıca iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörler, kofaktör, enzim miktarı gibi etkenlerin de enzim aktivitesini etkiledikleri bilinmektedir [1, 3].

Sıcaklık: Bir reaksiyonun hızı, tepe hızına ulaşılan kadar sıcaklıkla birlikte artış gösterir. Bu artış, enerji bariyerini geçmek ve reaksiyon ürünlerini oluşturmak için yeterli enerjiye sahip olan moleküllerin sayısının artması sonucudur. Sıcaklığın çok fazla yükselmesiyle enzimin sıcaklığa bağlı denatürasyonunun bir sonucu olarak reaksiyon hızında bir düşüş gerçekleşir. Çoğu insan enzimi için optimum sıcaklık 35 ile 40°C arasındadır. İnsanda bulunan enzimler 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaya başlar, ancak termal sularda bulunan termofilik bakteriler 70°C'lik optimum sıcaklıklara sahip olabilirler [3].

pH: H⁺ konsantrasyonu, reaksiyon hızına farklı şekillerde etki eder. Birincisi, katalitik süreç, genellikle enzim ve substratın etkileşime girmesi için iyonize veya kaynaşmış halde spesifik kimyasal gruplara sahip olmasını gerektirir. Örneğin, katalitik

aktivite, enzimin bir amino grubunun protonlanmış formda olmasını gerektirebilir ($-NH_3^+$). pH'nın ekstreleri aynı zamanda enzimin denatürasyonuna da yol açabilir, çünkü katalitik olarak aktif protein molekülünün yapısı, amino asit yan zincirlerinin iyonik karakterine bağlıdır. pH optimizasyonu farklı enzimler için değişir. En yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği pH her enzim için farklılık gösterir. Genellikle enzimin vücutta faaliyet gösterdiği pH'ı yansıtır. Örneğin; midede sindirim enzimi olan pepsin, pH'ın 2 olduğu ortamda maksimum aktiftir, nötr pH'ta çalışmak üzere tasarlanan diğer enzimler, pH'ın 2 olduğu bu tür asidik bir ortam tarafından denatüre olurlar [3].

Substrat konsantrasyonu: Kimyasal reaksiyonlar için geçerli sayılan genel kinetik prensipler, enzimli reaksiyonlar için de geçerlidir. Enzimli bir reaksiyonun hızı (v), birim zaman başına düşen ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır. Hız, genellikle dakikada oluşturulmuş ürünün molü olarak ifade edilir. Enzim katalizli bir reaksiyonun hızı, maksimum hıza (V_{max}) ulaşılan kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon oranının dengelenmesi, mevcut enzim molekülleri üzerindeki tüm mevcut bağlanma bölgelerinin substratı ile doygunluğu yansıtır. Enzim substratına doyduğu zaman substrat konsantrasyonu arttırılsa bile reaksiyonun hızı değişiklik göstermez. Farklı enzimlerin maksimum hızları (V_{max}) farklıdır [1, 3].

1.1.3. Enzim inhibisyonu

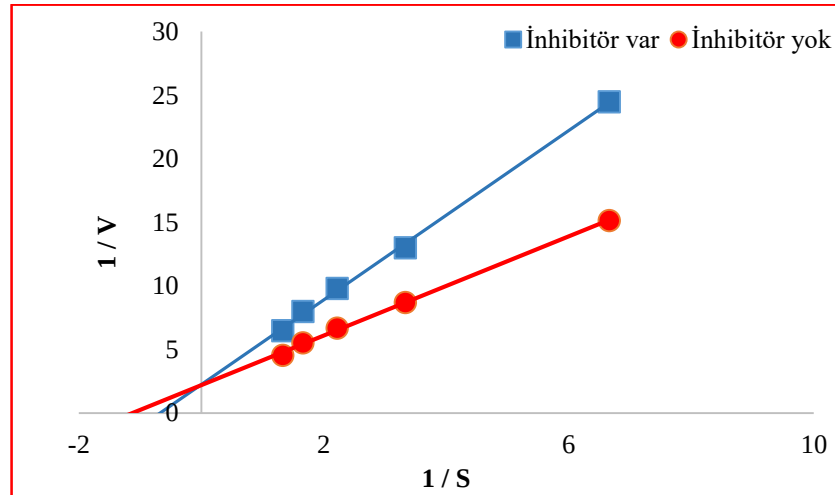
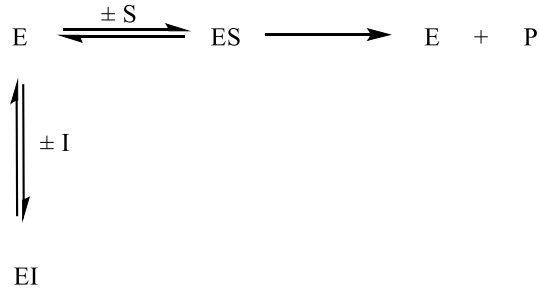
Enzim katalizli bir reaksiyonda, enzimin aktivitesini azaltan ya da durduran maddeler inhibitör olarak adlandırılır. Gerçekleşen olaya ise enzim inhibisyonu adı verilir. Enzimler neredeyse tüm hücresel süreçleri katalizlemede yer alırlar. Bu yüzden ki enzim inhibitörleri bilinen en önemli farmakolojik ajanlardır. Örneğin; aspirin, çoğu prostaglandinlerin sentezinde birinci basamağı katalizleyen enzimi inhibe edebilir. Yapılan çalışmalar sayesinde enzim inhibisyonu ve enzim mekanizmaları ile ilgili elde edinilen bilgiler bazı metabolik yolların aydınlatılmasını sağlamıştır [1, 2].

Genel olarak enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. dönüşümsüz inhibitörler kovalent bağlar yoluyla enzimlere bağlanır. Ya da ayrışması zor bir kompleks oluştururlar. Dönüşümlü inhibitörler tipik olarak kovalent olmayan bağlar yoluyla enzimlere bağlanır, böylece enzim-inhibitör kompleksinin seyreltilmesi, tersine çevrilebilir bağlı inhibitörün ayrışması ve sonrasında enzim aktivitesinin tekrar kazanımı ile sonuçlanır. Dönüşümlü inhibisyon türleri kompetitif (yarışmalı) inhibisyon,

nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon ve unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon olmak üzere 3 grupta incelenir [1, 3].

Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon:

Yarışmalı inhibitör substrata benzer yapıdadır ve substrat ile rekabet ederek enzimin aktif bölgesine bağlanır. Yarışmalı inhibitörün etkisi, artan substrat ile tersine çevrilir. Yeterince yüksek substrat konsantrasyonunda, inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Enzimin $V_{\max}$ değerinde değişim olmaz. Yarışmalı bir inhibitör, belirli bir substrat için K_m 'yi artırır [3].

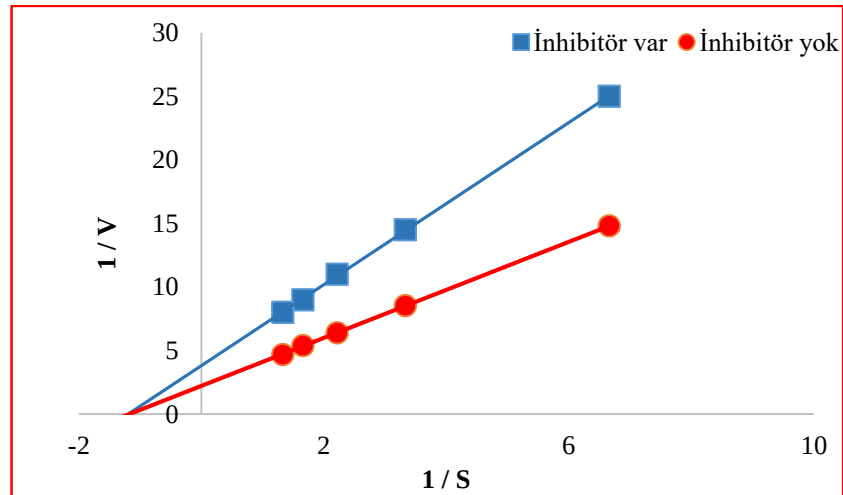
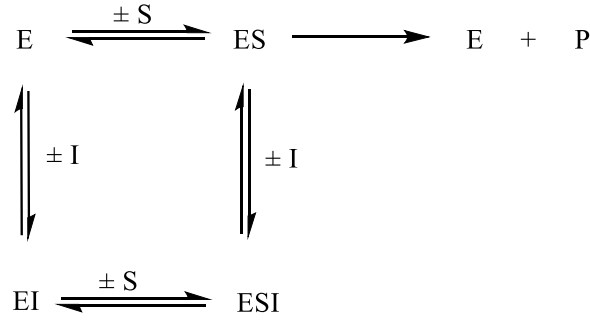


Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyon grafiği [1]

Nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon:

Bu tip inhibisyon, $V_{\max}$ üzerindeki karakteristik etkisiyle tanınır. Yarışmasız inhibisyon, inhibitör ve substratın enzim üzerinde aynı anda farklı bölgelere bağlanmasıyla ortaya çıkar ve aralarında rekabet yoktur. Yarışmasız inhibitör, serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabilir, böylece reaksiyonun oluşmasına engel

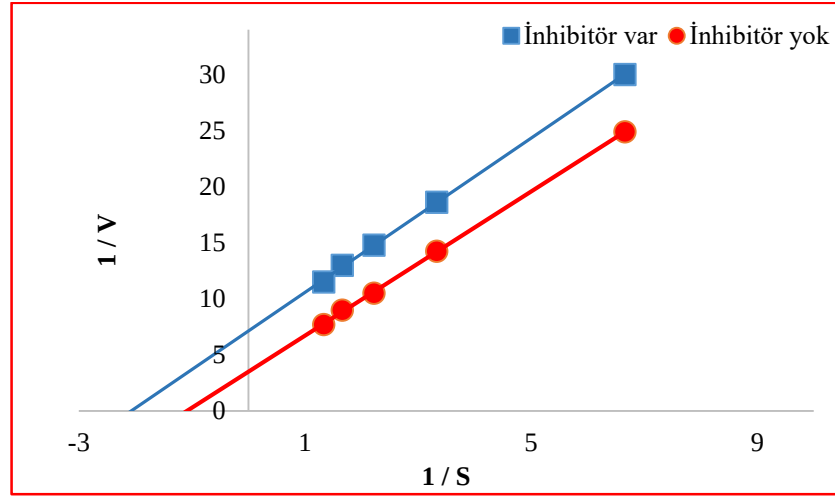
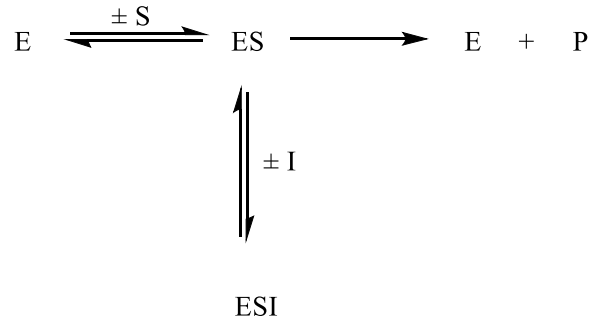
olabilir. Substrat konsantrasyonunu arttırarak inhibisyonun üstesinden gelinemez. İnhibitör, turnover sayısına etki ettiğinden dolayı enzimin aktivitesini düşürür. Bu yüzden yarışmasız inhibitör varlığında reaksiyonun $V_{\max}$ 'ı azalır. Ayrıca yarışmasız inhibitörler substratın enzime bağlanmasına herhangi bir engel teşkil etmezler. Böylece enzim, ortamda inhibitör varken de aynı K_m 'ye sahiptir, yani K_m değişmez [1, 3].



Şekil 1.4. Yarışmasız inhibisyon grafiği [1]

Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon:

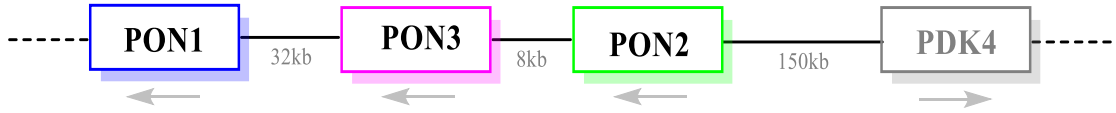
Yarı yarışmalı inhibisyonunda inhibitör serbest enzim yerine, enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanabilir. Ortamda yarı yarışmalı inhibitör var olduğu sürece artan substrat konsantrasyonuyla inhibisyon da artar. Ortamda enzim-substrat (ES) kompleksi uzaklaşması sonucu enzimin substrata ilgisi azalır, K_m artar. Diğer yandan ortamda devamlı ESI kompleksi olacağından dolayı $V_{\max}$ düşer [1].



Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyon grafiği [1]

1.2. Paraoksonaz

Paraoksonaz ailesi, bilinen PON1 genine ek olarak, PON2 ve PON3 diye adlandırılan üç farklı enzim genine sahiptir. Bu genler insanlarda kromozom 7'de (q21.3-22.1 bölgesinde), farelerde ise kromozom 6'da lokalize olmuştur [7]. Oldukça benzer yapısal homolojiyi paylaştıkları bilinmektedir. Ayrıca memeli türlerinde bu genlerin birbirine %60 oranda benzer aminoasit dizilimine sahip olduğu ve %70 oranda benzer nükleotid içerdiği bulunmuştur [8]. PON1, ailenin diğer üyeleri olan PON2 ve PON3 ile kıyaslandığında 105 amino asiti kodlayan ekson 4'te üç ek nükleotid kalıntısının ayırt edici özelliğine sahiptir. PON gen kümesinde PON2'nin hemen yanında, pirüvat dehidrogenaz kinazlardan bir tanesini kodlayan gen bulunur. Bu gen, bazı çalışmalarda PON genotiplerinin diyabetik glisemik kontrol ile bağlantısını açıklayabilir [9, 10].



Şekil 1.6. *PON* gen kümesi için genetik harita [7]

1.2.1. PON1

PON1 enzimi günümüzde Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu tarafından arildialkilfosfataz (E.C. 3.1.8.1) olarak sınıflandırılır. E.C. 3 hidrolazları, E.C. 3.1 esterazları, E.C. 3.1.8 fosforik triester hidrolazları ifade eder. Sistematik adı arildialkilfosfatazdır. Enzim, adını ilk incelenen substrat olan paraoksonu hidrolize etme yeteneğine dayanarak almıştır ve paraoksonaz ismi yaygın olarak kullanılır [11, 12].

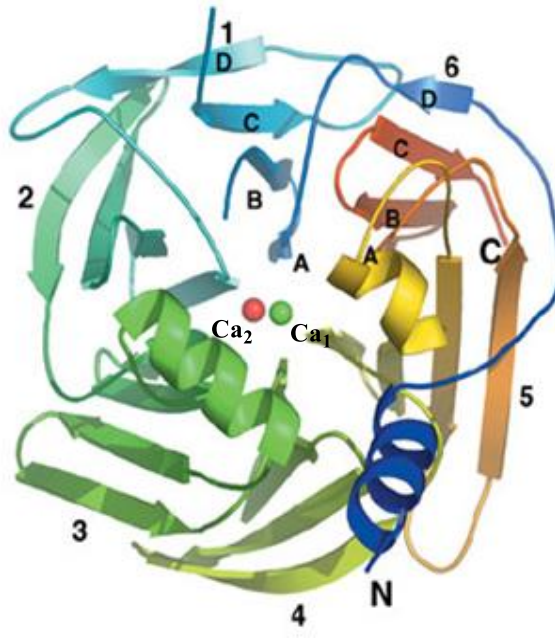
Bununla birlikte, son yıllarda elde edilen bilgiler PON1, PON2 ve PON3'ün, aromatik ve uzun zincirli alifatik laktonları hidrolize etme kabiliyetinin olduğunu, bu nedenle laktonaz teriminin de bu enzimler için uygun olabileceğini göstermektedir [13].

Saflaştırılmış insan serumu paraoksonazı (PON1), 43-45 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir ve molekül kütlesinin %15,8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içerir. Enzimin izoelektrik noktası 5,1 olarak belirlenmiştir. Aminoasit bileşiminde, nispeten yüksek bir lösin içermesi dışında olağan dışı bir özellik göstermez [14].

354 amino asitten oluşan bir proteindir. Olgun protein, başlatıcı metiyonin ayrıldıktan sonra hidrofobik sekansını korur [15].

Mevcut PON1'in kristal koordinatları; proteinin stabilitesi ve katalitik aktivitesi için iki kalsiyum iyonuna ve altı kanatlı pervane yapısına sahip karakteristik bir PON olduğunu gösterir [16].

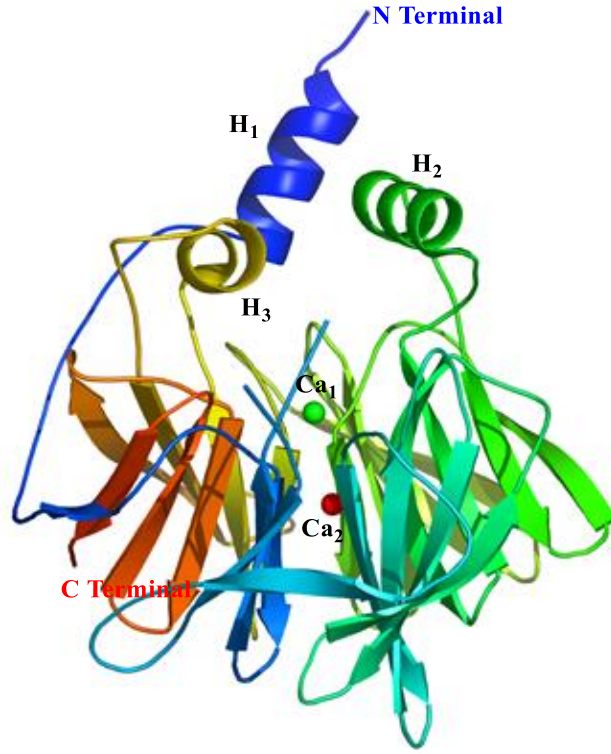
PON1 enziminin yapısında bulunan altı adet β -kırmalı tabaka, dört sıra halinde, pervane yapısında dizilmişlerdir. PON1, N terminaline yakın 6D tabakasında yer alan Cys42 ve 6C tabakasında yer alan Cys353 kalıntıları arasında oluşan disülfid bağı ile sonlanır. Böylelikle üç boyutlu yapı oluşmuş olur [17].



Şekil 1.7. *PON1*'in genel yapısının yukarıdan görünümü [16]

Kalsiyum iyonları bu enzimin katalitik mekanizmasında iki önemli rol oynar [18]. Kalsiyum iyonlarından biri "katalitik kalsiyum" iken, diğeri "yapısal kalsiyum"dur. Birinci Ca^{2+} , doğrudan katalitik reaksiyona katılır ve aktif bölgenin uygun konformasyonunu korumak için gereklidir [11]. Enzim-substrat kompleksinin oluşumunu kolaylaştırarak, ara maddelerin enzim ve ürünlere parçalanmasını hızlandırır [19].

Aynı zamanda yaklaşık 2,5 Å uzaklığında olan Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53 aminoasit kalıntıları, fosfat iyonunun oksijeni ve bir su molekülüyle etkileşimi vardır. İkinci Ca^{2+} , dietil fosfatın aktif bölgeden uzaklaştırılmasını kolaylaştırır ve paraoksonun çift bağını polarize ederek, fosforu nükleofilik atağa duyarlı hale getirir [11]. Katalitik kalsiyum olan kalsiyum iyonu (Ca_1) yüzeyde bulunurken, diğeri kalsiyum iyonu (Ca_2) merkezi bölgede bulunur. Kalsiyum iyonları birbirinden yaklaşık 7,5 Å kadar uzaklıktadır [20].



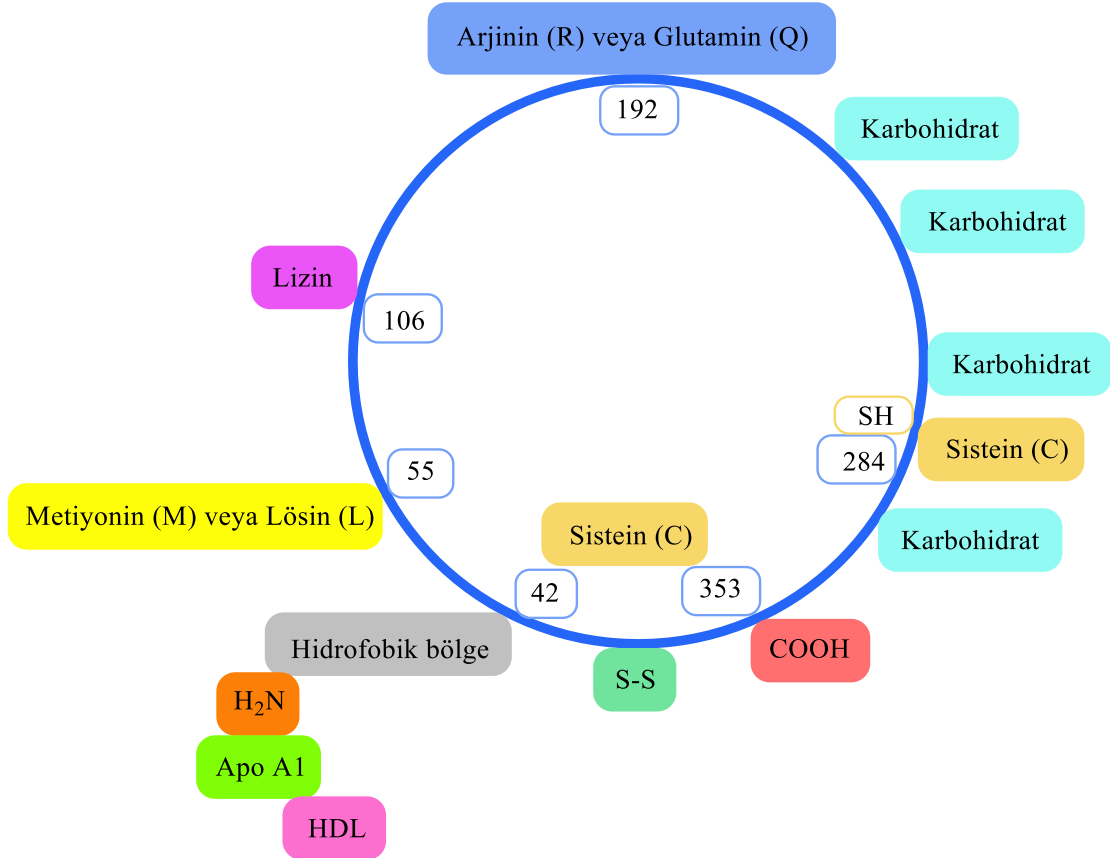
Şekil 1.8. *PON1* enziminin üç boyutlu yapısı [16]

PON1 enziminin yapısında kısaca H₁, H₂ ve H₃ olarak tanımlanan üç adet hidrofobik heliks yapı bulunmaktadır. Bunlardan H₂ ve H₃ heliks yapıları, aktif bölgenin yapısının belirlenmesi, aktif bölgenin korunması gibi görevlerin yanı sıra enzimin HDL'ye bağlanmasında da önemli rol oynar. H₁, H₂ ve H₃ yapıları bazı amino asitlerin (lösin, tirozin, triptofan) yan zincirleriyle meydana getirdikleri yapı karakteristiği sayesinde HDL'nin ara yüzeyine girerler [16].

Enzimin üzerinde potansiyel olarak toplam dört tane N-glukozillenme bölgesi mevcuttur. Bunlardan iki tanesi; Asn227 ve Asn270 β -kırmalı tabakaların merkezinde yer alırken, geri kalan iki tanesi; Asn253 ve Asn324 yüzey kısmına yakın yer alır. PON1 de memeli hücresinde ekspres edilir ve sonrasında bu bölgelerde glukozillenir [16, 21].

Kanıtlar iki yapısal izoformun olduğunu göstermiştir [22]. Bu izoformlardan birinde, bütün sistein kalıntıları serbest iken, diğerinde ise tek bir disülfür bağı ile PON'un iki oksidasyon durumu oluşturduğu görülmektedir. Bu yapısal izoformlar genetik izoformu belirleyen mutasyonlar ile açıklanamaz. Yüksek oranda saflaştırılmış aktif PON1, 283. pozisyonda tek bir serbest sistein ile Cys41 ve Cys352 arasında tek bir molekül içi disülfid bağı içerir [23].

PON1 gen sekansı ile ilgili yapılan araştırmalar yaklaşık 200 polimorfik bölge olduğunu göstermiştir [24]. PON1, iki ortak kodlama polimorfizmine sahiptir. Bunlardan ilki 55. pozisyonda bir metiyonin (M) ile lösinin (L) yer değiştirmesi ve ikincisi 192. pozisyonda arginin (R) ile glutaminin (Q) yer değiştirmesidir. Ek olarak, PON1 aynı bölgede en az üç yapısal değişkene sahiptir [25].



şekil 1.9. PON1 gen polimorfizmleri [26]

Glutamin için homozigot olan denekler, paraoksone karşı serum paraoksonaz aktivitesini arginin için homozigot deneklere göre anlamlı ölçüde düşürürken, heterozigot deneklerde orta seviyeler vardır. Bununla birlikte, bu polimorfizm, fenilasetat gibi diğer substratlara karşı aktiviteyi etkilemez. 55. pozisyonda yer alan diğer polimorfizm L55M, enzimin içsel aktivitesini o kadar net bir şekilde etkilemez, bununla birlikte, plazma içindeki konsantrasyonunu modüle ettiği gösterilmiştir [27].

PON1 aktivitesi, özellikle substrat spesifikliği ve bunlara karşı afinite açısından, 192 Q/R polimorfizminden güçlü bir şekilde etkilenmiş gibi görünmektedir. 192R ve

192Q, katalitik aktivitelerinde sentetik substratlara karşı farklılık gösterir. Amino asit 192, katalitik aktivitede ve HDL'ye bağlanmada önemli bir role sahiptir. Paraoksondaki hidrolitik aktivite, PON1 192RR ve PON1 55LL bireylerinden saflaştırılmış PON1 enziminde en yüksek ve PON1 192QQ ve PON1 55MM bireylerinden saflaştırılmış PON1 enziminde en düşük seviyededir R/Q izoformları ayrıca stabilite ve laktonaz aktivitelerini de değiştirir. PON1 192R, diğer test edilen varyantlara kıyasla homosistein tiyolaktonunun (HSTL) hidrolize edilmesinde daha etkilidir. Özellikle, makrofaj kolesterol akışının da, PON1 polimorfizmi tarafından modüle edildiği rapor edilmiştir. PON1 55L izoformunda, PON1 55M'ye kıyasla daha yüksek serum aktivite stabilitesi ve proteoliz direnci gözlenmiştir. Ayrıca, 55L, proteinin yapısında kilit bir rol oynamaktadır [27].

PON1'in LDL oksidasyonuna karşı koruyucu yeteneği, paraokson hidrolitik aktivitesinin aksinedir. PON1 55MM ve PON1 192QQ izoformları daha yüksek koruyucu etkiye sahiptir [28]. R allelinin oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu sırasında sentezlenen potansiyel kanserojen ürünleri detoksifiye etme kabiliyetine sahip PON1 enziminin üretilmesine yol açabileceği öne sürülmüştür [29, 30].

Bununla birlikte, en belirgin kodlama polimorfizmleri (Q192R ve L55M) özel patofizyolojik öneme sahiptir. Çok sayıda çalışma, her iki polimorfizmin KVH, inme, ailesel hiperkolesterolemi, tip II diabetes mellitus ve Parkinson hastalığı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir [25]. Bazı epidemiyolojik çalışmalar, PON1 polimorfizmleri ile jinekolojik kanser ve beyin kanseri gibi farklı kanser türleri arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir [31, 32]. Q/Q genotipinin taşıyıcılarında akciğer kanseri gelişme riskinin daha yüksek olduğu görülmüştür [33]. Bir meta-analiz PON1 polimorfizmleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır ve PON1 M ve Q allellerinin artmış meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir [34].

PON1 geninin polimorfizmi, PON1'in kan seviyelerini ve bunun katalitik etkinliğini etkiler. Her iki faktör de bir bireyin ateroskleroz ve kirleticilere ve böcek ilaçlarına karşı duyarlılığını güçlü şekilde etkiler [21].

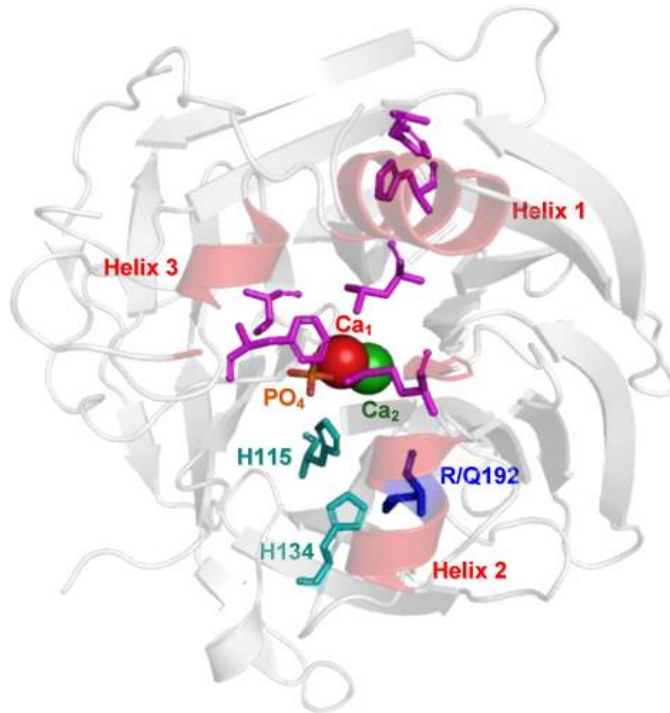
Organofosforlu böcek ilaçlarının tipik bir örneği olan paratyon, genellikle tarım alanında nispeten toksik olmayan tiyosülfür türevleri olarak uygulanır. *In vivo* olarak, oksidatif kükürt giderme olarak bilinen bir işlemle yüksek toksik oksijen (okson) analoguna, sitokrom-P450'ye bağımlı mikrozomal monooksijenazlar tarafından aktive edilirler. Bu işlemin, büyük ölçüde karaciğerde gerçekleştiğine inanılır; burada glutation-

S-transferazlar, monooksijenazlar ve paraoksonazlar gibi hem iyonları hem de oksonları detoksifiye edebilen birkaç enzim vardır. Dolayısıyla hepatik OP metabolizmasının dengesi detoksifikasyon yönüne doğru olmaktadır [35].

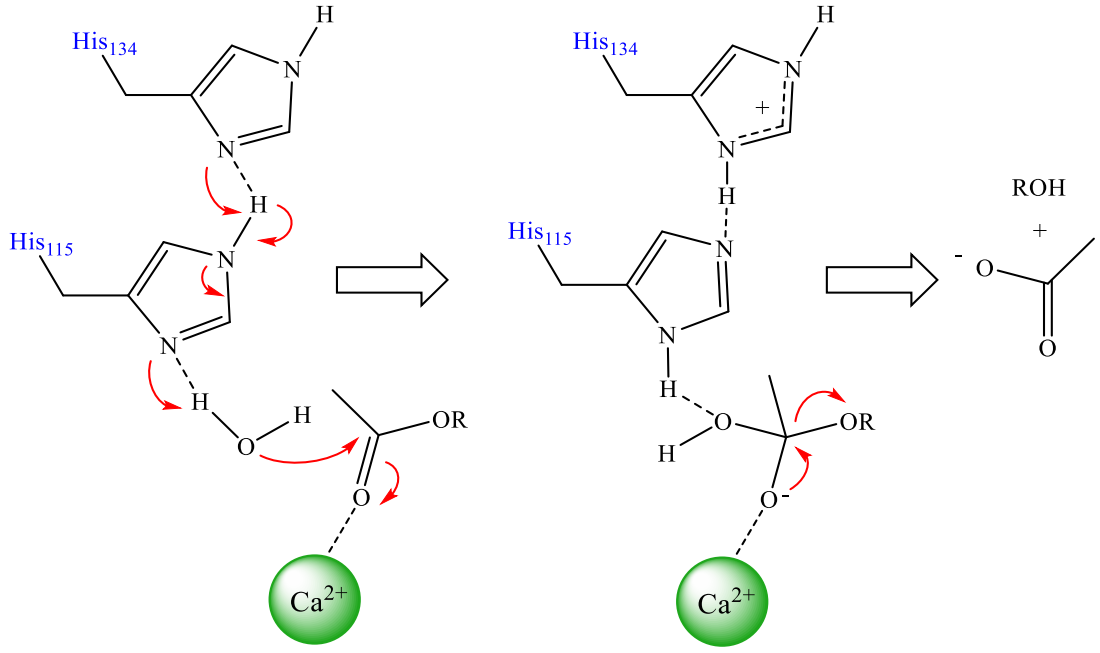
Memeli canlılarda, hepatik detoksifikasyona girmeyen okson, OP eyleminin yeri olan beyine ulaşmadan önce kanda serum PON1 ile hidrolize edilebilir. Bazı OP'lerde, örneğin; primifosmetiloksonda, serum PON1 ile hidroliz o kadar hızlıdır ki, aktif OP'nin aslında bu yolla beyine ulaşmadığı düşünülmektedir [36]. Birçok çalışma, serum PON1'in, memelilerde çeşitli OP'lerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir [37].

PON1'in katalitik etkisi

Histidin amino asitleri (His115-His134), Ca^{2+} iyonu, PO_4^{3-} iyonu ve H_2O molekülü PON1 enziminin aktif bölgesinde bulunur. Bu amino asit çifti, iyonlar ve H_2O molekülü esteraz aktivitesi için önemlidir [16].



Şekil 1.10. PON1'in aktif bölgesinde bulunan amino asitler ve iyonlar [16]



Şekil 1.11. *Paraoksonazın katalitik mekanizması (Fenilasetat ve naftilasetat gibi substratların PON1 enzimi tarafından hidrolizi) [16]*

Kristal yapıda görülen iki Ca^{2+} iyonundan, katalitik olarak aktif olan Ca^{2+} ve fosfat iyonu aktif bölge boşluğunun altında yer alır. Ca^{2+} ile bu fosfat iyonunun oksijenlerinden birinin uzaklığı 2,2 Å'dur. Hidrolitik enzimlerde, histidin çoğu zaman bir baz olarak işlev görür. Su molekülünü deprotonlar ve böylece nükleofilik hidroksit iyonu oluşmasını sağlar. Şekil 1.11'de His115, tek bir su molekülünü deprotonlayarak nükleofilik hidroksit üretir. His134 ise His115'in bazalitesini arttırmak için bir proton mekiği mekanizmasında hareket eder. İlginç bir şekilde His115, birçok enzimin katalitik kalıntılarındaki gözlenen çarpık iki düzlemlilik açıları benimser. His115'in oluşturduğu nükleofilik hidroksit iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırırken oluşan ara ürün Ca^{2+} iyonu ile kararlı hale gelir. Son yapıdaki Ca^{2+} iyonu negatif yüke sahip oksijenden uzaklaşır. Bu sırada bağ yeniden karbonilin ya da fosfatın üzerine yıkılır ve ester bağı kopar [38].

PON1'in aktivitesi

Birçok çalışmada PON'ların fizyo-patolojik rolleri gösterilmiş olsa da, fizyolojik substratları henüz bilinmemektedir. PON1, paraokson (dietil p-nitrofenil fosfat) gibi organofosfatlar ve aromatik esterler dahil olmak üzere birçok organik substratı *in vitro* olarak hidrolize edebilir, ancak primer aktivitesinin laktonaz olduğu bilinmektedir [39].

PON1 aktivitesi için çok önemli olduğu tespit edilen amino asit rezidüleri, Lys70, Tyr71, Leu240, Val346, Phe292, Ile291, Phe222, Leu69, His115, His134, His285, Thr332, Leu267 ve Phe347'yi içerir [16, 40].

PON1 aktivitesi sülfidril reaktifleri tarafından inhibe edilir ve bu inhibisyon sistein ile tersine çevrilebilir. Dolayısıyla, bir sistein kalıntısı aktif bölgenin temel bir bileşeni olabilir. Yapılan çalışmalar, Cys283'ün paraoksonun hidrolizi için gerekli olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, PON1'in aktif bölgesinin yapısı tam olarak belirlenmemiştir. PON1'in, diğer hidrolazlarda yaygın olarak bulunanlara benzer bir katalitik üçlü amino asit grubu içerip içermediği bilinmemektedir [11].

His115'in paraoksonaz aktivitesine dahil olduğunu gösteren doğrudan bir kanıt yoktur. Son zamanlarda yapılan bir çalışma, Tyr71, Pro72, Arg192, Leu191, Met196, Asp188, Pro189, Phe222 ve Phe292'nin paraoksonaz aktivitesindeki önemini ortaya koymuştur [41].

Bunlar arasında His115-His134 çiftinin laktonaz aktivitesi için katalitik olarak önemli olduğu öne sürülmüştür [42]. Laktonaz aktivitesi, PON2 ve PON3 tarafından da gerçekleştirilir. PON aktivitelerini değerlendirmek için spektrofotometrik analizler uygulanır. Paraokson, fenil asetat ve dihidrokumarin veren paraoksonaz (PON), arilesteraz (ARE) ve PON'lerin laktonaz (LAT) aktivitelerini hidrolize etme yeteneklerine dayanır. PON3 ayrıca statinleri hidrolize edebilir ve statinaz aktivitesi substratlar olarak statinler (simvastatin veya lovastatin gibi) kullanılarak değerlendirilebilir. PON'ların protein seviyeleri, spesifik antikorlar tarafından immünolojik yöntemler kullanılarak ölçülür [39, 43].

PON1'in substratları

Özellikle antikolinesteraz ajanları ve organofosfatlar (OP'ler) en yaygın kullanılan böcek ilaçlarından birisidir [12]. Çiftçilerin yıllarca kullandıktan sonra sahip oldukları olumlu fikir, birçok zararlı tür üzerindeki etkinliği, düşük maliyeti, genel kullanılabilirliği ve mükemmel çevresel profilleri nedeniyle popüler olmuşlardır [44].

Organofosfor bileşikleri, yalnızca tarımda kullanılmaz; OP'ler ayrıca kimyasal savaş ajanları (sarin veya soman), alev geciktiriciler, yakıt katkı maddeleri, yağlayıcı madde ve glokomdaki ekotiyofat gibi farmasötikler olarak da uygulanabilir [45, 46]. Pestisitler, savaş ajanları veya farmasötikler olarak kullanımlarının aksine, diğer

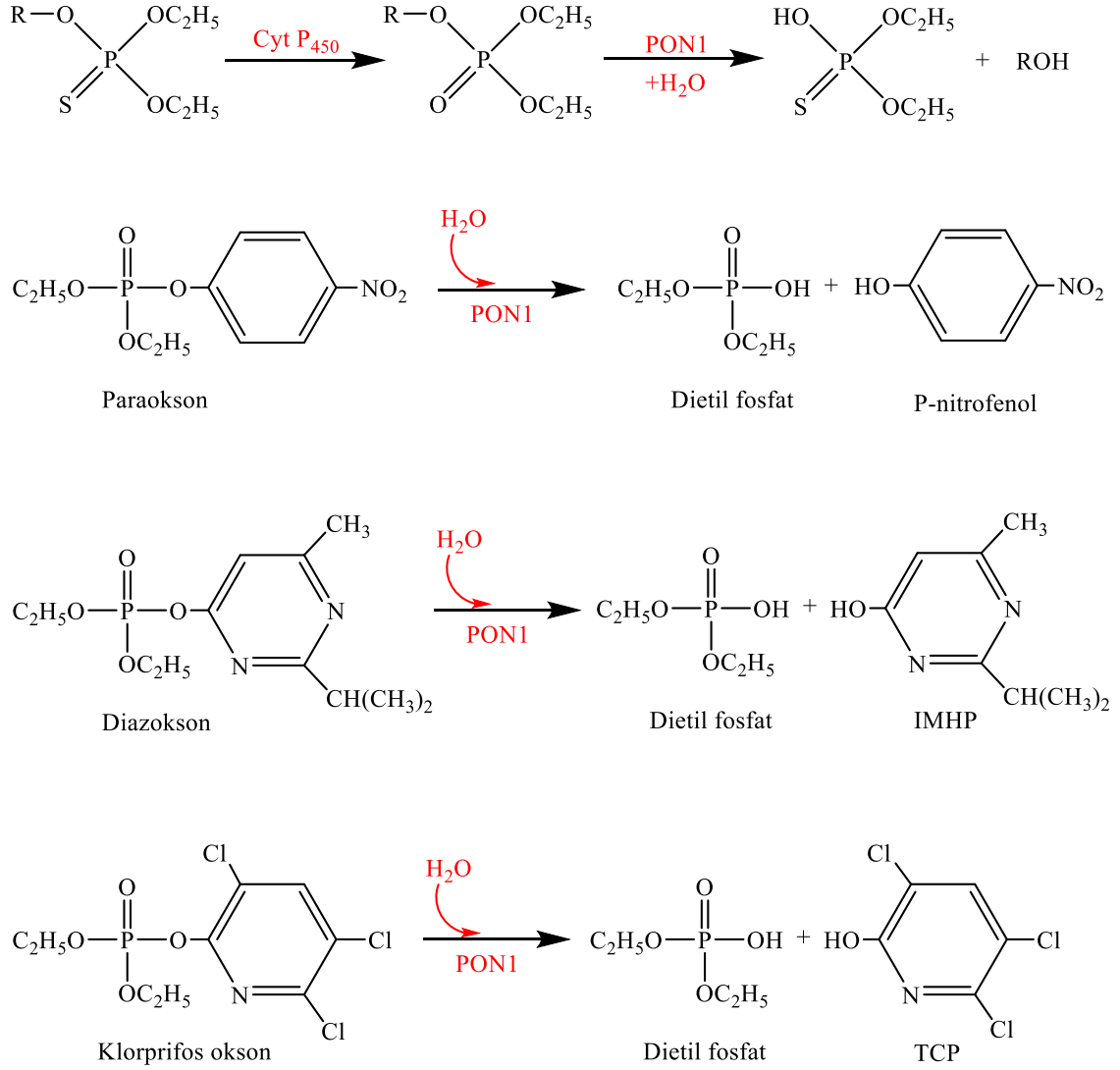
kullanımlar için tasarlanan OP bileşikleri AChE karşıtı çok az aktivite gösterirler ya da hiçbir aktivite göstermezler [46].

Bu maddeler, asetilkolinesteraz enzimi (AChE) üzerinde etki etmek, asetilkolinin hidrolizini inhibe etmek ve böylece nöromusküler sinapslarda nörotransmitter birikimine yol açmak üzere tasarlanmıştır [47, 48]. Bununla birlikte, OP'ler türe özgü değildir, bu nedenle insanlar dahil memelilere yüksek toksisite gösterebilirler. Yüksek derecede toksik olmasından dolayı hem oral hem de dermal yollardan maruz kalma, insan antikolinesteraz zehirlenmesinin ana kaynağıdır [44].

1953'te Aldridge ve diğerleri, OP hidrolazlarını şu şekilde sınıflandırmıştır; OP'leri katalitik olarak hidrolize eden A-esterazlar; OP'ler tarafından geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe edilen esterazlar; ve son olarak OP'lerle etkileşimde bulunmayan C-esterazlardır [49].

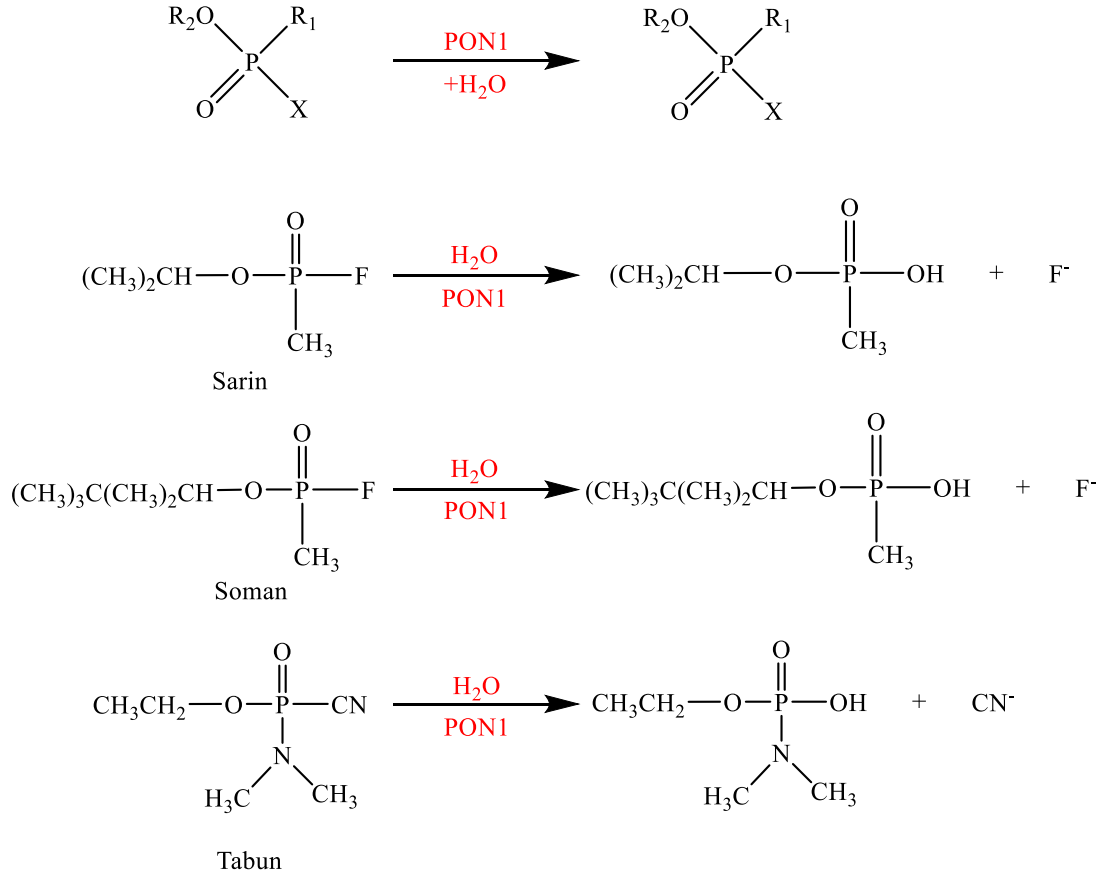
PON1, karaciğerdeki pestisit faz-I metabolizmasından kaynaklanan oksonları detoksifiye eder. Diazinon, klorpirifos ve paratyon gibi bileşikler, sitokrom P450'ler ile karşılık gelen oksonlara oksitlenir ve daha sonra DEP (dietil fosfat), TCP (trikloropiridinol), MHP (metil pirimidinol) ve PNP (para-nitrofenol) gibi spesifik metabolitlere hidrolize edilir [50].

PON1 için kesin bir “doğal” substrat bulunmamasından dolayı, PON1 aktivitesini ölçmek için çeşitli fizyolojik olmayan substratlar kullanılır. Bu substratların birçoğu, özellikle organofosfatlar, yüksek derecede toksiktir. Örneğin, paraokson, hidrojen siyanür gazının LD₅₀'sinin 12 ppm olduğu ve otomatik analiz sistemleri için uygun olmadığı aynı ölçekte 0,5 ppm LD₅₀'ye sahiptir [51].



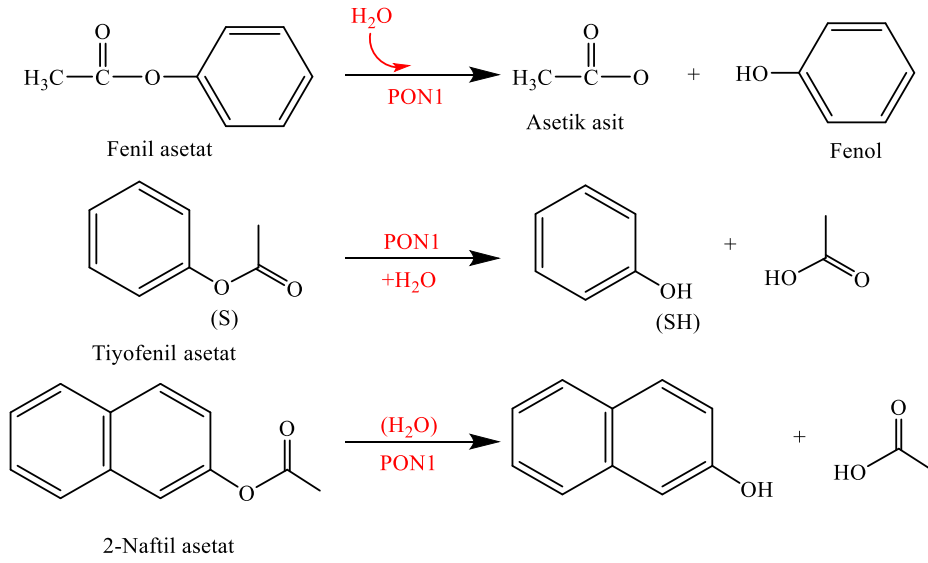
Şekil 1.12. Yaygın olarak kullanılan insektisitlerin okson metabolitlerinin PON1 ile hidrolizi [21, 50]

Kimyasal savaş sinir ajanları G ve V tipi olmak üzere iki ana sınıftır. G tipi sinir ajanları arasında tabun (GA), sarin (GB), soman (GD) ve siklosarin (GF) bulunur. Bunlar, oda sıcaklığında yüksek uçuculuklarından dolayı oldukça toksiktir ve maruz kalma durumunda büyük bir soluma ve dermal tehditi oluşturur. Sinir ajanları ve ilgili bileşikler, geri dönüşümsüz şekilde asetilkolinesterazı (AChE) inhibe eder, böylece kolinerjik sinir sisteminde hızlı, hayatı tehdit eden bir asetilkolin birikmesine neden olur. Yakın zamanda keşfedilmiş katalitik biyo temizleyicilerden biri, sinir ajanlarını hidrolize etme potansiyeline sahip olan PON1'dir. Ek olarak kardiyoprotektif yapısı ve PON1'in geniş substrat spesifitesi, onu terapötik bir katalitik biyo temizleyici geliştirilmesi için tercih edilen bir aday yapar [52].



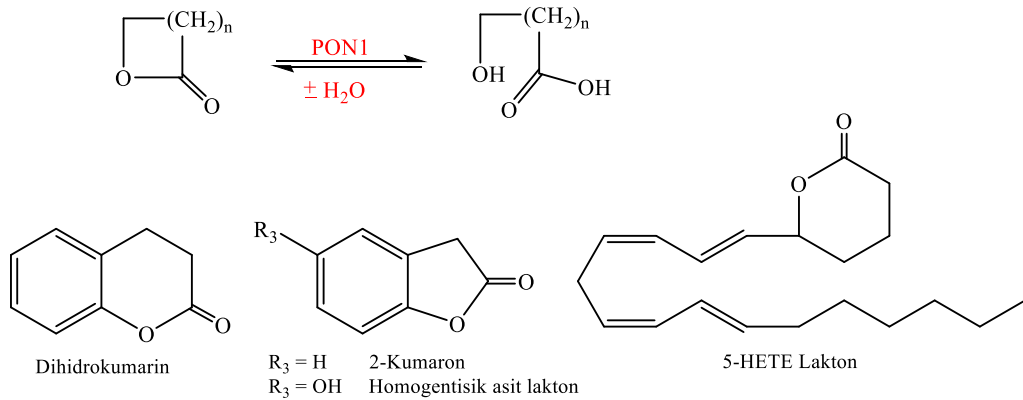
Şekil 1.13. Kimyasal savaş ajanlarının PON1 ile hidrolizi (sinir gazları) [21, 50]

PON1 için aromatik ester substratları arasında fenilasetat, tiyofenil asetat ve 2-naftilasetat bulunur. Arilesteraz aktivitesi, substrat olarak fenil asetat kullanılarak belirlenir [35].



Şekil 1.14. Aromatik esterlerin PON1 ile hidrolizi [21, 50]

Laktonlar, sulu bir ortamda kapalı (lakton) ve açık (hidroksi asit) formları arasında dengede bulunan dahili esterlerdir. Dengedeki lakton/hidroksi asit oranı pH'a bağlıdır, kapalı form düşük pH değerlerinde tercih edilir. Laktonun halka boyutu, halka üzerindeki sübstitüentler ve çiftin varlığı gibi laktonun yapısal özelliklerinden büyük ölçüde etkilenebilir. Son yıllarda PON1'in ilaçlar ve endojen bileşikler dahil olmak üzere 30'dan fazla lakton ve siklik karbonat esterini hidrolize ettiği gösterilmiştir [53]. Örneğin; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -bütirolakton ve homosistein tiyolakton gibi [54, 55]. PON1 ayrıca γ - ve δ -hidroksikarboksilik asitlerin ters reaksiyonunu, laktonizasyonunu katalize eder [53].



Şekil 1.15. Laktonların PON1 ile hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonizasyonu [21]

Laktonlar, bitkilerin ortak bileşenleri olduklarından ve birçok gıda ürününde doğal tatlandırıcı ajanlar olarak kullanıldıklarından, laktonaz aktivitesi, PON enzimlerinin önemli bir ortak özelliğini temsil edebilir. Diyet ve çevresel laktonlara karşı korunma, memeli PON enzimlerinde bulunan dengeli polimorfizmlerin korunmasından sorumlu seçici bir güç olabilir [56].

PON1'in aromatik laktonlara karşı gösterdiği afinite, alifatik laktonlara gösterdiği afiniteye oranla daha yüksektir ve böylece aromatik laktonları kolayca hidrolizleyebilmektedir. Lakton halkasında α - β karbonil çift bağı içeren kumarin bu genellemeye uymaz ve PON1 tarafından hidrolizlenemez. Ancak dihidrokumarin kolaylıkla hidrolizlenebilir [54, 57].

PON1'in fizyolojik özellikleri ve hastalıklar ile ilişkisi

PON1, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ilişkili bir serum enzimidir. Birincil işlevi, yaygın olarak kullanılan insektisitleri ve sinir gazlarını parçalamaktır [58]. Bu nedenle, serum paraoksonaz, bu toksik çevresel kimyasallara kronik maruz kalma nedeniyle zehirlenmeye karşı koruyucu bir rol oynayabilir [59].

Böbrekler, yaygın ksenobiyotik metabolize edici çoğu enzime sahiptir ve böylece vücutta, ilaçların ve yabancı bileşiklerin metabolizmasına önemli bir katkıda bulunabilirler. Ksenobiyotik metabolizmasının evre I ve evre II'sinde yer alan anahtar enzimler için böbrek lokalizasyonu, katalitik aktivite, gelişimsel düzenleme, indüksiyon, cinsiyet ve tür farklılıkları hakkında genel bir bilgi verilmektedir.

İmmunohistokimyasal analizde, glomerüler yumaktaki ve proksimal tübüllerdeki epitel hücrelerinde lokalize olabildiği gösterilen PON1 için ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna fonksiyonel anlamda katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu ve toksik etkilere karşı organizmanın korunmasında PON1'in önemli bir rol aldığı kanısına varılmıştır. Bunda renal epitel hücrelerde bulunan anyon transport sistemi ve PON1'in benzer şekilde intrasellüler dağılımının olması etkilidir [60].

İnsan serumundan saflaştırma sırasında Apo A1'in PON1'den çıkarılması son derece zordur; bu, Apo A1 ve PON1'in yakından ilişkili olduğu önerisine yol açmıştır. Ayrıca, HDL alt türlerinden olan klusterin ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. PON1, onu HDL lipidlerine tutturabilecek oldukça hidrofobik bir N-terminal ucuna sahiptir [61].

PON1'in düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksidasyona karşı korumada; lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) veya Apo A1'den daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak PON1'in antioksidan etkisinin LCAT ve Apo A1 varlığında az miktarda arttığı kanıtlanmıştır. PON1'in, LDL parçacıklarında birikmeden önce lipit peroksitlerin parçalanmasından büyük ölçüde rol oynadığı anlaşılmıştır. Ayrıca PON1 HDL'yi oksidasyona dirençli hale getirir ve insan aterosklerotik lezyonlarında lipit peroksitleri hidrolize eder. PON1'in öncelikle bazı laktonlara veya hidroksil asitlere etki eden bir laktonaz olduğunun kanıtlanması nedeniyle fizyolojik rollerinden birisi de, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan kaynaklanan lipit türlerinin metabolizmasıdır [39, 62].

PON1 ve HDL arasındaki ilişki benzersiz bir düzenlenmeye dayanır. HDL, PON1'in salgılanmasını kolaylaştırır ve sabitlenmesi için hidrofobik bir ortam sunar. Ayrıca, optimum PON1 aktivitesi için gerekli olan hidrofobik bir ortam sağlar [63]. Buna karşılık, enzim HDL'nin oksidasyonunu önler ve ters yönde kolesterol taşınmasının kapasitesini artıran hücrelerden kolesterol akışını uyarır. Bu nedenle, PON1 ve HDL arasındaki ilişki hem normal hem de patolojik koşullar açısından önemlidir [64]. PON1, HDL kolesterol ve LDL kolesterol arasındaki lipit transferinin etkinliğini de etkileyebilir [8].

Yapılan çalışmalarda PON1'den yoksun olan farelerin ateroskleroz ve organofosfat zehirlenmesine karşı oldukça hassas olduğu görülmüştür [65]. *In vitro* analizler, PON1 ve PON3'ün düşük yoğunluklu lipoproteinde, lipid oksidasyonunu inhibe ettiğini, böylece aterosklerozun başlatılmasında rol oynayan okside lipitlerin seviyelerini azalttığını göstermektedir [62].

Ayrıca, Rodrigo ve arkadaşları, PON1'in bakteriyel endotoksinlere karşı korunmada bir rol oynayabileceğini, oksidatif ajanlara ve serbest radikallere, akut veya kronik maruz kalma geçiren hücresel membranlar için stabilize edici bir özelliğe sahip olabileceğini göstermiştir. Bu kimyasallar, seçici geçirgenlik fonksiyonlarının yeteneğini zorlamaktadır. Halen devam etmekte olan deneysel çalışmalara dayanarak, PON1'in ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı (KKH) gelişmesine karşı korunmada önemli bir rol oynadığı sonucuna varılabilir [66].

PON1'in yeni doğanlarda ortaya çıkmasının gelişimsel zaman sürecinin incelenmesi; doğumda, bebeklerin PON1 seviyelerinin yetişkinlere göre yalnızca dörtte biri ya da üçü oranında olduğunu ve yetişkinlerdeki PON1 seviyelerine ulaşmak için 6

aydan 2 yıla ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. PON1, çocukların klorpirifos veya diazinon maruziyetlerine karşı hassasiyetinin arttığını gösterir [67, 68]. Son zamanlarda, PON1 aktivitesinde yaşlanma ile birlikte anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir [69].

Tablo 1.2. *PON1, PON2 ve PON3'un biyolojik rolleri [70]*

Biyolojik rolü	PON1	PON2	PON3
Organofosfat metabolizması	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> 'a karşı koruma	+	+	+
Lipid metabolizması	+	+	+
Oksitlenmeye karşı koruma	+	+	+
Apoptoza karşı koruma	-	+	-
Enflamasyona karşı koruma	+	+	+

Ateroskleroz gelişimine yol açan iki hastalık olan insüline bağımlı diabetes mellitus ve hiperkolesterolemi olan bireylerde PON1 aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür [71].

PON1 aktivitesindeki azalma, HDL'deki düşüşlerle açıklanamamıştır; bu, PON1'in bir şekilde ateroskleroz gelişiminde rol oynadığı hipotezine yol açmıştır [72].

Miyokard infarktüsü geçirmiş hastalarda PON1 aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir [73].

Yapılan bazı çalışmalar erken miyokard enfarktüsü geçiren hastaların çocuklarının PON1 aktivitesinin kontrol grubundaki çocuklara göre daha düşük olduğunu göstermiştir [74].

PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunun sağlıklı kişilerde serum HDL-kolesterol ve Apo A1 konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [75].

PON1 aktivitesi fizyolojik koşullara ve patolojik durumlara bağlı olarak değişebilir. Örneğin, serum PON1 aktivitesi hamilelik ve menopoza sırasında önemli ölçüde azalır. Düşük PON1 aktivitesi böbrek hastalığı, diabetes mellitus ve karaciğer sirozunda belirlenmiştir [76].

Diyet ve yaşam tarzı faktörleri de PON1 aktivitesini etkileyebilir. Bozulmuş yemeklik yağın ve aterosklerojenik bir diyetin tavşanlarda, farelerde ve insanlarda PON1 aktivitesini azalttığı görülmüştür. C ve E Vitamini alımı, PON1 aktivitesinin artması ile ilişkilidir [77].

Sigara dumanı ekstraktlarının enzimin aktif bölgesindeki sistein üzerindeki doğrudan etkisinden dolayı sigaranın PON1 aktivitesini azalttığı bildirilmiştir [78].

Orta derecede etanol alımı, PON1 polimorfizmi ile ilgili olmayan PON1 aktivitesinde bir artış ile ilişkilidir [79].

Üç PON izoenziminin de, düşük yoğunluklu lipoproteinlerde ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde lipit peroksitlerini parçalama özelliği vardır [39]. Ek olarak, PON2 hücre içi oksidatif stresi ve apoptozu azaltır [80].

PON1 durumundaki değişiklikler viral enfeksiyonlarda da gözlenir. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu olan hastalar sıklıkla enfeksiyonun kendisi veya antiretroviral tedavilerin ikincil etkileri ile açıklanabilen proterojenik metabolik değişiklikler geliştirir [81]. Yapılan çalışmalarda HIV enfeksiyonu olan hastalarda serum PON1 aktivitesinin azaldığını ve kontrol bireylerine göre hastalarda konsantrasyonunun arttığını göstermektedir [82].

Anti-tümör ilaçlarının PON'lara etkisi çok fazla araştırılmamıştır. Kemoterapötik bir ilaç olan siklofosamid ile tedavi edilen sıçanlarda iki katlık bir renal PON1 aktivitesi artışı gösterilmiştir [83]. Bunun aksine, saflaştırılmış PON1 kullanılarak kemoterapötik ajanlarla (setuksimab, paklitaksel, etoposid, docetaksel ve ifosfamid) inkübasyonlarında *in vitro* olarak PON1'in azalmış bir aktivitesi gözlenmiştir [84].

Serum PON1'in genetik veya çevresel düzeylerini etkileyen faktörler, HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruma kapasitesini etkiler ve sonuç olarak ateroskleroz ile bağlantılı olabilir [85]. Bu, özellikle oksidatif stres riskinin büyük ölçüde artmış vasküler hastalık insidansına ve diğer komplikasyonlara katkıda bulunmasının önerildiği diyabetik hastalarla ilgilidir. Diyabetik hastalarda reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, kronik hiperglisemi, hiperinsülinemi, yüksek serbest yağ asitleri ve dislipidemi olabilir [86].

PON1, diyabetik hastalarda sağlıklı insanlara göre daha az oranda HDL ile bağlanır ve aktivitesi daha sonra zayıf şekilde stabilize edilir [87]. Birkaç çalışmada DM'li hastalarda azalmış PON1 aktivitesi seviyeleri saptanmış ve nedensel olarak diyabetik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkili bulunmuştur. Paraoksonaz proteininin daha büyük bir kısmı, endojen dolaşımdaki bir inhibitör varlığından veya belki de paraoksonazın artan glikosilasyonundan dolayı diyabette inaktif olabilir. Apo A1'in paraoksonaz proteinine oranı, çalışılan tüm diyabetik popülasyonlarda düşük olarak saptanmıştır. Paraoksonazın normal kontrol deneklerinde olduğu gibi Apo A1 ve klusterin içeren aynı HDL alt sınıfında mevcut olup olmadığı bilinmemektedir. Ayrıca, klusterin serum konsantrasyonunun diyabetik olmayan popülasyonlara kıyasla diyabetik olarak farklı olup olmadığı da bilinmemektedir [88].

Serum PON1 aktivitesi, PON1 kodon 192 genetik polimorfizmi ve gen-çevre ve / veya gen-gen etkileşimleri nedeniyle bireyler ve popülasyonlar arasında büyük farklılıklar gösterir [89]. Mackness, Aviram ve diğerleri, saflaştırılmış PON1 Q'nun (düşük aktivite fenotipi) LDL peroksidasyonuna karşı korunmada PON1 R'den daha etkili olduğunu [85, 90], Cao ve diğerleri, QQ ve RR diyabetik hastalarından PON1'in LDL peroksidasyonunu benzer ölçüde azalttığını göstermiştir. PON1 kodon 192 genetik polimorfizminin, enzimin antioksidan kapasitesi üzerinde bir etkisi olmadığını öne sürmektedir [91].

PON1 aktivitesi, akciğer kanseri, gastrointestinal kanser gibi farklı kanser türlerinden etkilenen hastaların serumunda anlamlı derecede düşüktür. PON1 aktivitesi ile bazı insan tümörlerin verileri arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür. Gastrik kanser, meme kanseri, epitel over kanseri ve mesane kanseri tarafından etkilenen hastalarda, hastalığın evresi ve derecesine bağlı olarak daha düşük bir PON1 aktivitesi tanımlanmıştır. Obezite, ailesel hiperkolesterolemi ve diabetes mellitus gibi oksidatif stres ve dislipidemi ile ilişkili hastalıklardan etkilenen hastaların serumlarında düşük PON1 aktivitesi değerleri bildirilmiştir [82].

Klinik düzeyde, çalışmalar obezitenin bozulmuş PON1 aktivitesi ile ilişkili olduğunu ve obez bireylerin bozulmuş mitokondriyal fonksiyonla ortaya çıktığını göstermiştir. Morbid obez hastalarda kol gastrektomisi ile tedavi edilen ve ameliyattan bir yıl önce ve bir yıl sonra çalışılmış olan gözlemsel ve prospektif bir çalışma, karaciğer steatozunun ciddiyetinin tüm hastalarda neredeyse ihmal edilebilir seviyelere düştüğünü göstermiştir. Serum PON1 aktivitesinin obez hastalarda ameliyattan önce çok düşük olduğu (normal popülasyonda elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında), ancak ameliyattan bir yıl sonra kuvvetli bir şekilde arttığı görüldü.

Ayrıca, ameliyat öncesi hastaların anlamlı olarak daha düşük digliseritlere, fumarat, NADH, ATP ve UTP'ye sahip olması; büyük olasılıkla, mitokondriyal yağ oksidasyonu ve glukoz taşıma aktivitesinin koordinasyonunda bir işlev bozukluğu olduğunu gösterir. Bu sonuçlar, düşük PON1 aktivitelerinin, morbid obez bireylerde mitokondriyal değişikliklerle ilişkili olduğunu göstermektedir [92].

PON geni ve Alzheimer hastalığı arasındaki korelasyon birkaç nedenden dolayı etkileyicidir. Enzimin, aterogenez ve demansa yatkın olan lipid peroksidasyonunun önlenmesinde önemli bir fonksiyonel rolü vardır. Dahası, son kanıtlar, PON1 geninin hastalığın kolinesteraz inhibitörlerine tepkisine olası bir şekilde dahil edildiğine işaret

ederek, Alzheimer hastalığı tedavisi için potansiyelini gösterir. Düşük serum PON1 aktivitesi, advers kardiyovasküler olayların yüksek riski ile ilişkili bozukluklarda tanımlanmıştır ve bunun demanstaki etkisinden kesinlikle şüphelenilmektedir. Yapılan gözlemler PON'un, Alzheimer hastalığı, lipid peroksidasyon ve aterosklerozun yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [93].

Pasca ve diğerleri otistik hastalarda hem PON1 arilesterazı hem de PON1 paraoksonaz aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Çalışmaları ayrıca, otizmlı çocuklarda, glutatyon peroksidaz aktivitesi, düşük PON1 arilesteraz aktivitesi ve yetersiz vitamin B12 seviyeleri ile negatif ilişkili olan daha yüksek homosistein seviyelerinin olduğunu göstermektedir [94].

Tablo 1.3. *PON1, PON2 ve PON3'ün normal hücrelerdeki biyolojik rolleri [82]*

Antioksidan rolü	
Plazma lipoproteinlerin metal iyonları tarafından katalize edilen lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi	PON1
AAPH tarafından indüklenen hücre (HUVEC, eritrosit) membranının lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi	PON1, PON2
AAPH tarafından indüklenen hücre (HEK 293T hücreleri) membranının lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisi	PON1, PON2
Hücreye karşı koruyucu etki (HAEC, makrofajlar) LDL'nin oksidatif modifikasyonu ve MM-LDL'nin monosit kemotaksisini indüklemeye yeteneğinin azaltılması	PON2
Makrofajlarda hücre içi ROS oluşumunun artmasına karşı koruyucu etki	PON2
DMNQ tarafından vasküler hücrelerde üretilen hücre içi ROS üretiminin azaltılması	PON2
Striatal ve serebellar astrositlerde ve striatal nöronlarda H ₂ O ₂ ve DMNQ ile indüklenen hücre içi ROS oluşumuna karşı koruma	PON2, PON3
Mitokondriyal disfonksiyon ve antiapoptotik özelliklere karşı koruma	
Mitokondride (HeLa hücreleri, HEK hücreleri) mitokondriyal kompleks III ile birleşen koenzim Q10'a ve C57BL/6J farelerinden elde edilen karaciğer ve kalplere bağlanır	PON2
DMNQ ile tedavi edilen insan endotel hücrelerinde mitokondriyal süperoksit oluşumunun ve apoptozun önlenmesi	PON2, PON3
İnsan endotel hücrelerinde antiminisin veya oligomisin ile indüklenen mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesi	PON2
Kaspaz-3 ve hücre içi ATP aktivasyonuna karşı koruyucu etki, insan endotel hücrelerinde ve insanlarda antrasiklin doksorubisine cevap olarak azalır.	PON2, PON3
Hücrelerde DNA hasarı veya starosporin ile indüklenen intrinsik apoptoza karşı koruma	PON2, PON3
Farklı ER-stres-indükleyici bileşikler ile muamele edilmiş insan endotel hücrelerinde endoplazmik retikulum stres kaynaklı ROS oluşumuna ve apoptoza karşı koruyucu etki	PON1
Homosistein-tiyolaktone karşı koruma	
Homosisteinin toksik bir metabolitinin, lizin kalıntıların <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> homosisteinlelasyonu ile proteine zarar veren homosistein-tiyolaktone detoksifikasyonu	PON1
Lipoproteinlerin protein homosisteinlenmesine karşı koruma	PON1
Fare modelinde beyinde hidrolize ederek Hcy-tiolakton nörotoksitesine karşı koruma	PON1, PON2
Lipid metabolizmasının modülasyonu	
Makrofajlarda kolesterol biyosentezinin inhibisyonu	PON1, PON2
Makrofajlarda kolesterol akışının uyarılması ve artmış HDL aracılı ters kolesterol taşınması	PON1
Makrofajlarda ve köpük hücre oluşumunda hücre trigliserit birikimine karşı koruyucu etki	PON1

1.2.2. PON2

Paraoksonaz ailesinin ikinci üyesi olan PON2 enzimi ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. PON2 yaygın olarak ifade edilen bir hücre içi enzimdir ancak plazmada saptanabilir değildir. Yaklaşık 43 kDa molekül kütleğinde olan bu enzim vücutta; kalp, karaciğer, böbrek, ince bağırsak, akciğer, kas, beyin, pankreas ve testis gibi farklı dokuların yanı sıra, endotelial hücreler, trakeal epitel hücrelerinde ve makrofajlarda bulunur. Fare ve insan beyinde PON2 mRNA'da bulunmuştur. Çoklu mRNA formlarına sahip olabilir [95-97].

PON1 gibi, PON2 de LDL'nin hücre aracılı oksidatif modifikasyonunu önleyebilir. Ancak LDL oksidasyonuna karşı koruyucu faaliyetlerinin mekanizmasının tam olarak açıklığa kavuşturulması için çalışmalar devam etmektedir. PON2, yalnızca arter ortamında değil, vücuttaki birçok dokuda yer aldığı için, hücre içi veya lokal oksidatif stresi düşürmede gözle görülür şekilde rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca hücresel düzeyde antioksidan etkisinin de var olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla PON2'nin bir fonksiyonu hücrelerin oksidatif strese karşı korunması için bir hücresel antioksidan olarak davranması olabilir [95, 98].

PON2'nin iki yaygın polimorfizm vardır. Pozisyon 148'de alanin/glisin ve pozisyon 311'de sistein/serin amino asitlerinin yer değişimi ile polimorfizm görülür. PON2'deki polimorfizmler; lipoproteinlerin sentezi veya salgılanması üzerinde fonksiyonel bir etkiye sahip olup, lipid metabolizması yolundaki lipoprotein lipaz veya hepatik lipaz gibi bazı önemli enzimleri inhibe ya da aktive edebilen PON aktivitesini etkilemektedir. Açlık plazma glukozundaki varyasyon ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca tip 2 diyabet, alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla da ilişkilidir [7, 99].

1.2.3. PON3

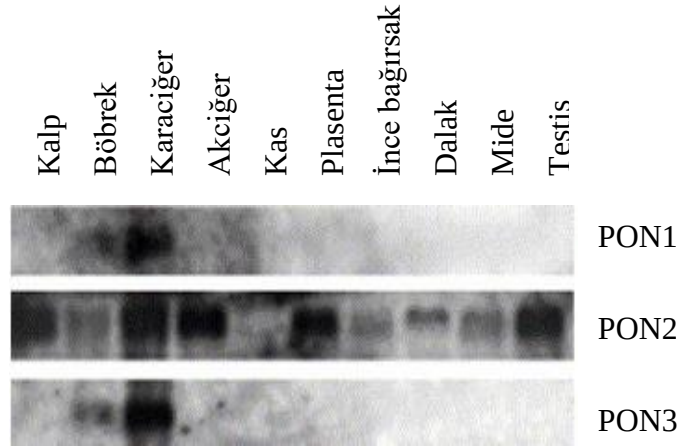
Paraoksonaz ailesinin üçüncü ve son üyesi olan PON3, insanlarda 7. kromozom üzerinde PON1 ve PON2 arasında bulunur. Karakterizasyonu çok fazla bilinmeyen PON3, yaklaşık 40 kDa molekül kütleğine sahip serum HDL fraksiyonu ile ilişkili bir enzimdir. PON3 ekspresyonunun primer bölgesi karaciğer gibi görünse de böbrekte önemli miktarda PON3 mRNA'ya rastlanmıştır [10, 98].

PON3 için iki polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlar pozisyonun 311'de görülen serin/treonin ve pozisyon 324'te görülen glisin/aspartik asit amino asitlerinin yer

değişimleridir. Bu polimorfizmlerin protein aktivitesinde fonksiyonel değişikliklere neden olup olmadığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır [99].

PON3, familyanın diğer üyelerinde olduğu gibi antioksidan özelliğe sahiptir. Draganov ve arkadaşları, serumdan saflaştırılmış tavşan PON3'ün, *in vitro* koşullarda bakır kaynaklı LDL oksidasyonunu inhibe edebildiğini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışma mikrogram esasında ele alındığında tavşan PON3'ün, tavşan PON1'e oranla LDL'yi oksidasyona karşı korurken mikrogram esasında ele alındığında 100 kat fazla güçte olduğunu göstermektedir [99].

PON3 izoenziminin doğal substratları bilinmemekle birlikte PON1 izoenziminin substratları olan paraokson ve fenilasetatı hidrolizleyememektedir. Bu yüzden de paraoksonaz aktivitesi göstermez. Az oranda arilesteraz aktivitesi gösterir. Laktonazları ise hızlıca hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Veriler PON3'ün, potansiyel olarak toksik endojen laktonları hidrolizleyerek vasküler hasarı koruduğunu göstermektedir [7, 54, 100].



Şekil 1.16. İnsan PON gen ailesinin doku dağılımı [13]

1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin (ROS / RNS) ortaya çıkması ile organizmanın antioksidatif koruma sistemleri ile etkilerini önleme kapasitesi arasındaki denge eksikliği olarak tanımlanmıştır [101]. En önemli ve temel elementlerden olan oksijen, bir yandan aerobik organizmalar için zorunluken diğer yandan hücrelerde oksidatif hasara neden olabilir. Oksidatif hasarlar, yaşam için en önemli olan DNA, RNA,

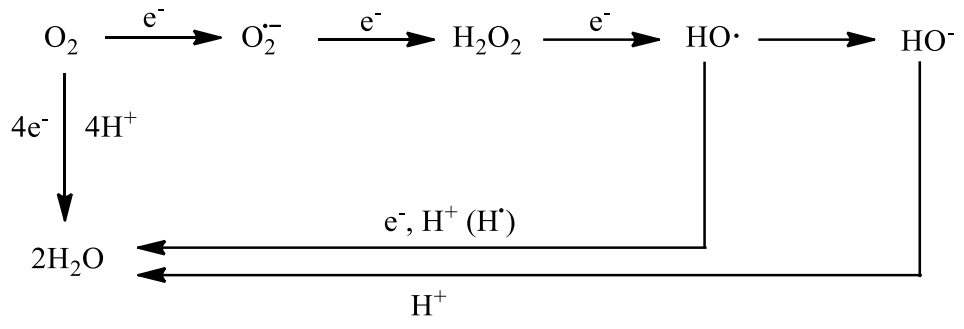
protein enzimleri, doymamış yağlar da dahil olmak üzere, her hücre tipi ve biyolojik molekülü ilgilendirir [102]. Söz konusu zararlar, nörodejeneratif, kardiyovasküler, kanser gibi çeşitli rahatsızlıklara yol açmaktadır. Oksijenin negatif etkisi ile yapılan değişiklikler doğrudan oksijen ile oluşturulan serbest radikal molekülleri ile bağlantılıdır. Bu yapılar bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren çok sayıda molekülü içerir. Serbest radikaller, homolitik, heterolitik veya redoks reaksiyonu olarak üretilebilirler ve genellikle reaktif oksijen türleri veya reaktif nitrojen türlerinden oluşurlar. Reaktif oksijen türleri, serbest radikal olmayan hidrojen peroksit gibi oksijen taşıyan serbest radikallerin yanı sıra diğer reaktif oksijen türlerini içerir. Benzer şekilde, reaktif nitrojen türleri hem nitrojen içeren serbest radikalleri hem de reaktivite merkezinin azot olduğu diğer reaktif molekülleri içerir [103, 104]. En önemli serbest radikalleri ve bunların aktif türevleri Tablo 1.4'te gösterilmiştir [102].

Tablo 1.4. *Reaktif oksijen ve nitrojen türleri [102]*

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Nitrojen Türleri	
Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$	Nitrik oksit	$\text{NO}^\bullet$
Ozon	O_3	Peroksinitrit	ONOO^-
Hidroperoksi radikal	$\text{HO}_2^\bullet$	Nitroksi anyonu	NO^-
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitrojen dioksit	$\text{NO}_2^\bullet$
Hidroksi radikal	$^\bullet\text{OH}$	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Süperoksit anyon radikali	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Nitröz asit	HNO_2
Lipit peroksi	$\text{LOO}^\bullet$	Nitril klorür	NO_2Cl
Peroksit	ROOH		
Hipoklorik asit	HOCl		

Radikal oksijen türleri hem endojen hem de eksojen olarak gelişir. Her durumda, bu biyokimyasal reaksiyonlar, membranlara veya hücrenin diğer kısımlarına saldırabilen yeni reaktif moleküllerin oluşumuna yol açar. Aldehitleri, amino asitleri, doymamış yağ asitlerini ve insan organizmasındaki diğer önemli bileşikler okside edebilirler [103].

Moleküllerin her biri farklı bir reaktivite ve seçicilik ile karakterize edilir. Bu, reaktivitenin ve seçiciliğin ters ilişkili olduğuna işaret etmektir. Bu olayın doğrulanması, en aktif olan hidroksil radikalının ($^\bullet\text{OH}$) reaktivitesinde görülebilir. Hidroksil radikali, zayıf aktivite sergileyen süperoksit radikal anyonundan ($\text{O}_2^{\bullet-}$) daha zayıf seçicilik gösterir. Hidroksil radikalının reaktivitesine özellikle dikkat edilmelidir [105].



Şekil 1.17. Moleküler oksijenin dört ve bir elektron şemaları ile azaltılması [103]

Tablo 1.5. Oksidanlar ve genel özelliklerinin özeti [106]

Oksidan	Formülü	Özellikleri
Süperoksit anyonu	$O_2^{\cdot-}$	O_2 'nin bir elektron azaltma durumu. Birçok otooksidasyon reaksiyonunda ve elektron taşıma zincirinde oluşur. Fe^{2+} 'yı demir-kükürt proteinleri ve ferritinden ayırabilir.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$O_2^{\cdot-}$ 'nin değişmesiyle veya O_2 'nin doğrudan indirgenmesiyle oluşan iki elektron azaltma durumu. Bilinen en güçlü oksitleyicilerinden biridir. Sulu çözelti içinde çeşitli inorganik iyonları oksitleyebilir veya azaltabilir.
Hidroksil radikal	$\cdot OH$	Fenton reaksiyonu ve peroksinitrit ayrışması ile oluşan üç elektron azaltma durumu. Yaklaşık 10^{-9} saniyede, çok kısa bir <i>in vivo</i> yarı ömre sahiptir ve yüksek bir reaktiviteyle çoğu hücresel bileşene saldırır. Neredeyse her tür makromoleküle zarar verebilir: karbonhidratlar, nükleik asitler, lipitler ve amino asitler gibi.
Organik hidroperoksit	$ROOH$	Lipidler ve nükleobazlar gibi hücresel bileşenler ile radikal reaksiyonlar sonucu oluşur. Spesifik fonksiyonel grup veya oksijen-oksijen tekli bağ içeren bir moleküldür Diğer oksijen bir hidrojen taşıdığına, buna hidroperoksit (R-O-O-H) denir.
Alkoksi, peroksi radikaller	$RO\cdot$, $ROO\cdot$	Oksijen merkezli organik radikallerdir. Lipit formları lipid peroksidasyon reaksiyonlarına katılır. Çift bağlara veya hidrojen ayrılmasına radikal eklenmesiyle oksijen varlığında üretilir.
Hipoklorit	$HOCl$	Myeloperoksidaz tarafından H_2O_2 'den oluşur. Tiyol grupları, amino grupları ve metiyonin de dahil olmak üzere protein bileşenlerini kolayca okside eder. Organik bileşiklerle reaksiyon çok ekzotermiktir ve tutuşmaya neden olabilir. Manganez bileşiklerini okside edebilir, onları permanganantlara dönüştürebilir.
Peroksinitrit	$OONO\cdot$	$O_2^{\cdot-}$ ve $NO\cdot$ arasında hızlı bir reaksiyonda oluşan bir oksidan ve nitratlama maddesidir. DNA ve proteinler de dahil olmak üzere hücrelerdeki geniş bir molekül dizisine zarar verebilir. Hidroksil radikal ve azot dioksit oluşturmak için homolitik bölünmeye uğrayabilir.

1.3.1. Serbest radikallerin çeşitli kaynakları

Daha öncede belirtildiği gibi endojen kaynaklar ve eksojen kaynaklar olmak üzere iki tane serbest radikal kaynağı vardır. Serbest radikallerin başlıca endojen kaynakları Tablo 1.6’da özetlenmiştir [107].

Tablo 1.6. Serbest radikallerin endojen kaynakları [107-110]

Fizyolojik Süreç	Yorum
Mitokondriyal solunum	Süperoksit anyon radikali üreten yaşamın temel süreci.
Otooksidasyon	İnsan vücudundaki birçok biyolojik molekülün (hemoglobin, miyoglobin, katekolaminler, vb.) Oto-oksidasyonu serbest radikaller üretebilir. Süperoksit oluşan birincil serbest radikaldir.
Enzimatik reaksiyon	Ksantin oksidaz, lipoksijenaz, aldehit oksidaz, vb. içeren birçok enzim reaksiyonu serbest radikaller üretebilir.
Solunum patlaması	Bu süreç, fagositlerin fagositoz sırasında büyük miktarda oksijen tükettikleri bir süreçtir.
Metal iyonlar	Vücut için gerekli olan bakır iyonu ve demir iyonu gibi metal iyonları, serbest radikaller üretmek için hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir.
Yorucu egzersiz	Serbest radikaller üreten ksantin oksidazı aktive edebilir.
Enfeksiyon	Serbest radikaller üretebilir, çünkü bağışıklık sistemi, istilacı mikroorganizmaları serbest radikallerin patlamasıyla nötralize etmeye çalışabilir.
İskemi / Reperfüzyon	Serbest radikal oluşumuna neden olan ksantin oksidazı aktive edebilir.

Dış kaynaklı serbest radikal kaynakları da vardır. Örneğin, kirli hava soluması insanları serbest radikallere maruz bırakabilir. Bu harici kaynaklar ise Tablo 1.7'de özetlenmiştir [111].

Tablo 1.7. *Dış kaynaklı oksidatif stres kaynakları [111, 112]*

Fizyolojik Süreç	Yorum
Hava kirliliği	Kirlenmiş havadaki partikül maddelerine maruz kalmak, önemli bir oksidatif stres yaratarak astım, kardiyovasküler hastalıklar, kronik pulmoner obstrüktif hastalık (KOAH) ve akciğer kanseri riskini artırabilir.
Havadaki inorganik parçacıklar	Endüstride çalışan bireylerde toz parçacıklarının yutulması, özellikle hava ince mineral tozu (kuvars, silika ve asbest) içeriyorsa oksidatif strese neden olabilir.
Tütün sigara	Tütün dumanında bulunan oksidanlar akciğerlere zarar verebilir, KOAH'a neden olur ve hatta akciğer kanseri riskini artırır.
Bazı ilaçlar	Bleomisin, adriamisin ve sülfasalazin gibi ilaçlar oksidatif stres oluşturabilir.
Endüstriyel çözücüler	Kloroform ve karbon tetraklorür gibi bazı endüstriyel solventler, solunduğunda oksidatif hasara neden olabilir.
Radyasyona maruz kalma	Aşırı ultraviyole ışığa maruz kalmak, güneşe uzun süre maruz kalmak (güneşlenmek) ve kanser tedavisinin bir parçası olarak radyasyon tedavisi oksidatif stresi arttırmaktadır.

Bazı ilaçlar da oksidatif stres üretebilir. Bu ilaçlar Tablo 1.8’de listelenmiştir. Çoğu insan için, bu ilaçları tıbbi gözetim altına almak herhangi bir sorun teşkil etmez. Bununla birlikte, glukoz 6-fosfat eksikliği olan bireyler, bu ilaçların bazılarından daha fazla toksisite riski altında olabilir. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, hücrel redoks dengesinde önemli bir enzimdir [113].

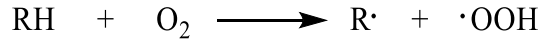
Tablo 1.8. Oksidatif stres oluşturabilecek ilaçlar [113]

İlaç sınıfları	İlaç adları
Ağrı kesici	Aspirin, fenasetin
Antikanser	Metotreksat, bleomisin, adriamisin, doksorubisin, topoizomera inhibitörleri, menadion
Antimalarial	Klorokin, meflokin, primakin, pamakin
İmmünoşüpresanlar	Siklosporin A, sirolimus, takrolimus, mikofenolik asit
Antibiyotikler	Kloramfenikol, siprofloksasin, moksifloksasin, nalidiksik asit, norfloksasin, ofloksasin, sülfonamid, Bactrim (sülfametoksazol ve trimetoprim), sülfadiazin, sülfanilamid, sülfasalazin, sulfafurazol
Antitüberküloz	<i>p</i> -Aminosalisilik asit, dapson
Antiretroviral ajanlar	İndinavir, atazanavir, azidotimidin
Diüretik	Spironolakton
Uyuşturucu	Kokain, ekstazi
Diğer ajanlar	Etil alkol (alkol)

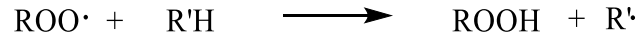
1.3.2. Serbest radikallerle biyomoleküllerin hasarı

Yüksek reaktivite nedeniyle, serbest radikaller, lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyomoleküllere zarar verebilir. Lipitler serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın başlıca hedefleridir. Lipit peroksidasyonu, membran akışkanlığı ve geçirgenliğinin değişmesiyle hücre zarı hasarına neden olabilir. Serbest radikallerin aracılık ettiği lipit peroksidasyonu, başlatma, çoğaltma ve sonlandırmayı içeren bir dizi zincir reaksiyonudur [114].

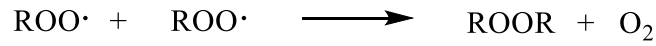
Başlangıç reaksiyonu [115]:



Gelişme reaksiyonu [115]:



Sonlanma reaksiyonu [115]:



Lipit peroksidasyonunu başlatabilen serbest radikaller arasında hidroksil radikali (en reaktif), alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri ve peroksinitrit bulunur. Bakırlı ve demirli iyonlar gibi metal iyonları da zincir başlangıcında katalitik olarak katkıda bulunabilir. Tüm çoklu doymamış yağ asitleri lipit peroksidasyonuna uğrayabilir. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan sorumlu olan iki enzim ailesidir [114].

Amino asitler ve proteinler, hidroksil radikalleri tarafından oksidatif hasara karşı hassastır. Proteinlerin reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri ile oksidasyonu, proteinlerin tüm amino asit kalıntılarının yan zincirlerini içerir. Özellikle, proteinlerin sülfür içeren sistein ve metiyonin kalıntıları, hem reaktif oksijen hem de reaktif azot türleri tarafından oksidasyona çok duyarlıdır. Sistein kalıntısının oksidasyonu, disülfidlerin oluşumuna yol açar ve metiyonin, metiyonin sülfoksit kalıntılarına oksitlenir. İnsan vücudunda bulunan redüktaz enzimleri, bu tür hasarı onarabilir [116].

Oksidatif stres aynı zamanda mitokondriyal DNA'ya da zarar verebilir ve bu hasar insan cildi de dahil olmak üzere çeşitli dokularda yaşlanma ve kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir [117].

1.4. Antioksidanlar

Antioksidanların “hedef bir moleküle oksidatif hasarı geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran herhangi bir madde” olarak bilinen klasik tanımı, genellikle bu bileşiklerin serbest radikalleri nötralize etme yeteneği olarak anlaşılmaktadır. Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşir:

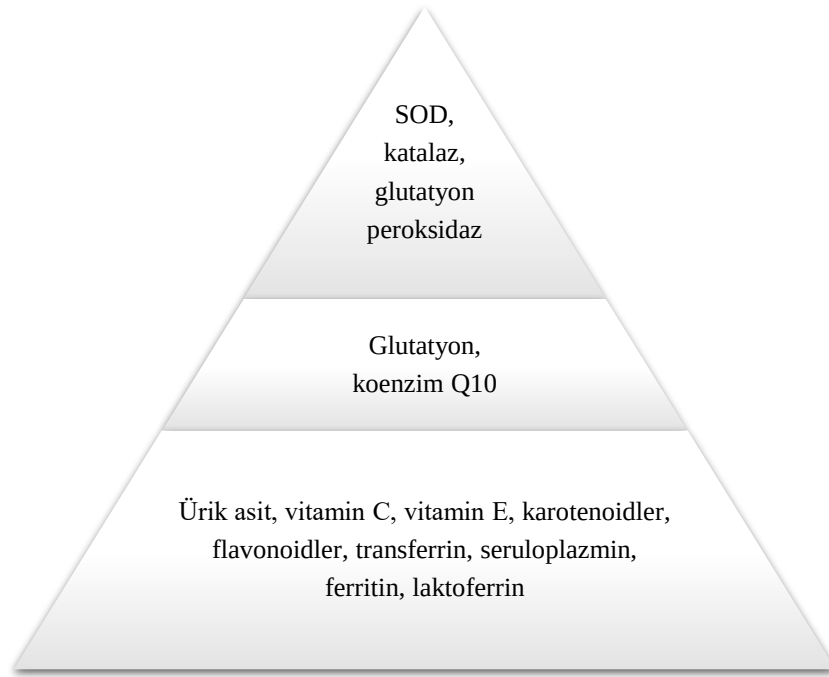


Burada AH ve SR, sırasıyla bir antioksidanı ve bir serbest radikali temsil eder. Bu nedenle reaksiyon, antioksidanların klasik etki mekanizmasının temeli olarak kabul edilir ve SR $\cdot$, lipitler, proteinler veya DNA'da indüklediği birçok zarar verici işlemi önleme veya geciktirme yeteneklerini açıklar.

Bununla birlikte, reaksiyon bir bileşiğin veya bir antioksidan içeren karışımın antioksidan aktivitesini etkileyen tüm faktörleri temsil etmemektedir. Bu faktörler arasında en önemlileri şunlardır: antioksidanların SR'ye karşı reaktivitesi, her bir antioksidan molekül tarafından nötralize edilmiş SR $\cdot$ moleküllerinin sayısı (stokiyometrik faktör, n), antioksidanın lipo-çözünürlüğü ve ikincil reaksiyonların varlığı [121].

1.4.1. Vücudun antioksidan savunması

Vücudun antioksidan savunması, hem endojen ve hem de diyet kaynaklı eksojen bileşiklerden oluşur. Bunlar; antioksidan enzimler, zincir kırıcı antioksidanlar ve metal bağlayıcı proteinler olmak üzere üç geniş kategoride incelenebilir. Başlıca antioksidan enzimler, endojen kökenli olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidazlardır. Serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarına müdahale eden antioksidanlar zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinir. Bu antioksidanlar ya suda çözünen ya da lipit olarak çözünebilen küçük moleküllerdir. Diyet yoluyla elde edilen bu antioksidanların bazıları; karotenoidler, flavonoidler ve antioksidan vitaminlerdir. Ferritin, transferrin ve seruloplazmin gibi endojen proteinler de önemli antioksidan proteinlerdir, çünkü bunlar bakır ve demir gibi metal iyonlarını bağlayabilir. Böylece serbest radikaller Fenton reaksiyonu yoluyla üretilmez. Genellikle tüm antioksidanlar oksidatif stresin nötralizasyonu için önemli olsa da, antioksidan enzimler en güçlü antioksidan savunmayı sağlar (Şekil 1.21) [112].

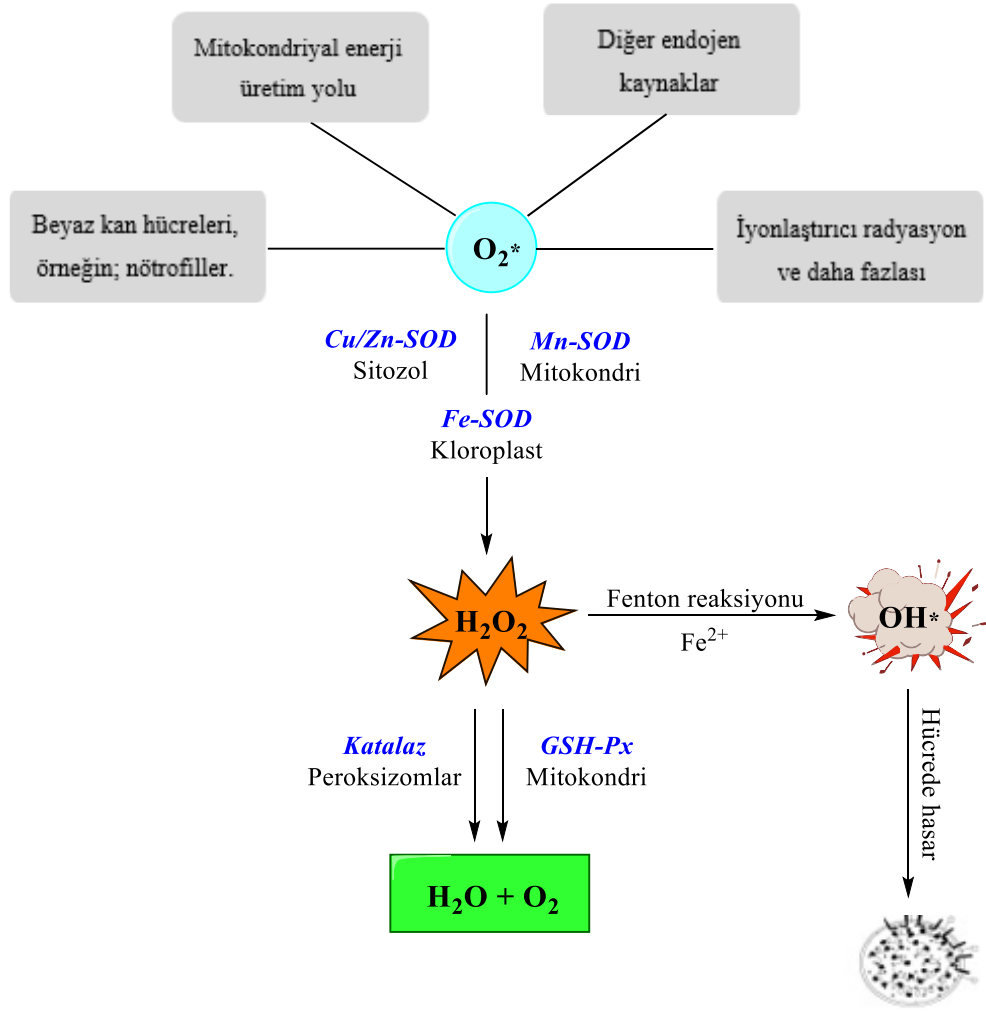


Şekil 1.19. Serbest radikallerin nötralize edilmesinde insan vücudundaki çeşitli antioksidanların etkinliği [112]

Antioksidanlar sadece bir sınıflandırmayla kısıtlı kalmayıp, çeşitli özelliklerine göre farklı gruplarda sınıflandırılmıştır. Tablo 1.9’da antioksidanların sınıflandırılmasına bir örnek gösterilmiştir.

Tablo 1.9. Antioksidanların sınıflandırılması [122]

Antioksidanlar			
Endojen Kaynaklı		Eksojen Kaynaklı	
Enzimler	Küçük moleküller	Sentetik	Doğal
Katalaz	Askorbik asit	BHA	Tokoferoller
Peroksidaz	Glutatyon	BHT	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	TBHQ	Fenoller
Glutatyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar	Propilgallat	Flavonlar
Glutatyon redüktaz	Tiyoredoksin	Kuersetin	Katekinler



Şekil 1.20. Antioksidanların reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizması [123]

1.5. Bitkiler

Bitki sistematiki, bitkilerin sınıflandırılmasını, bitkilerin isimlendirilmesini, bitkilerin teşhisini ve tayinini içerir. Sınıflandırmanın temel amacı, var olan bitkileri benzer ya da farklı özelliklerine göre gruplandırmaktır. İsimlendirmede amaç bir bitkinin ya da bitkinin ait olduğu grubun daha anlaşılır olması için tek bir bilimsel isim vermektir. Bunun için de eski bir bilim dili olan ancak günümüzde kullanılmayan latince belirlenmiş olup, belli başlı kurallara uygulanmıştır. Aynı zamanda toplumlar, bu latince bitki isimlerine karşılık olarak, konuştukları dilde kendilerinin anlayabileceği bir isim kullanmaktadırlar. Bitkilerin teşhisi veya tayini, o bitkinin daha önce bilinen bir bitki ile aynı olup olmadığını tespit etmektir. Bitkinin hangi yöreye ait olduğunun bilinmesi ve var olan tanıtıcı kitaplar bitkinin familyasının, cinsinin ve türünün belirlenmesinde önemlidir [124].

Eskişehir'in Uludere mevkiinden toplanan bitkiler, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalında, sırasıyla *Crataegus tanacetifolia*, *Rumex acetosella*, *Thymus sibthorpii* ve *Asphodeline taurica* olarak teşhis edildi.



Şekil 1.21. Bitkilerin toplandığı yer

1.5.1. Kotan alıcı (*Crataegus tanacetifolia*)

Tablo 1.10. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Rosales
Familya	Rosaceae
Alt familya	Amygdaloideae
Cins	<i>Crataegus</i>
Tür	<i>C. tanacetifolia</i>

1.5.1.1. Bitkinin genel özellikleri

Crataegus türleri eski zamanlardan beri kullanılmaktadır ve bitkinin antioksidan bileşenleri, terapötik etkilerini açıklayabilir. Asya, Orta Amerika ve Akdeniz’de yaygın olarak bulunan alıç türleri yenilebilen meyveleri için yetiştirilir. Türkiye, *Crataegus*'un genetik merkezlerinden biridir ancak türlerini tanımlamak için az sayıda çalışma yapılmıştır.

Türkiye’de *Crataegus* türlerinin yaprak, çiçek, meyve ve kökü geleneksel tıpta öksürük, grip, astım, mide ağrısı, romatizmal ağrı, nefrit, hemoroitler ve kalp hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Alıç bitkisinin çiçekleri ve meyveleri kardiyovasküler, hipertansiyon ve diyabetik hastalıkları tedavi eder. Buna ek olarak, kan basıncını ve toplam plazma kolesterol seviyelerini önemli ölçüde düşürür. Alıç sirkesi, Türkiye'nin bazı yörelerinde üretilmekle birlikte, alıcın meyve ve çiçekleri de çay olarak tüketilmektedir [125].

Yaklaşık 10 metre boylarında, dikenleri seyrek olan küçük ağaçlar ya da çalılardır. Mayıs ve temmuz ayları arasında çiçeklenen bitki genellikle sarı renkte meyve verir. İnce ve yumuşak tüylü yeşil yaprakları vardır [126].



Şekil 1.22. *Crataegus tanacetifolia* bitkisi [126]

1.5.1.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması

Kotan alıcı, çiçeklendiği ve sarı renkte meyve verdiği aylar olan Mayıs ve Temmuz ayları aralığında toplanır. Güneş ışığı almayacak şekilde gölgede ve standart oda koşullarında kurutulur. Deneysel çalışmalarda kullanılabilecek karanlık ve nemsiz ortamda saklanır.

Kotan alıcı, Eskişehir'in Uludere mevkiinden, enlem: 39.977600, boylam: 30.328071 koordinatlarını içerisine alan meradan toplandı.

1.5.2. Kuzukulağı (*Rumex acetosella*)

Tablo 1.11. *Rumex acetosella* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Eudicots
Alt sınıf	Core eudicots
Takım	Caryophyllales
Familiya	Polygonaceae
Cins	<i>Rumex</i>
Tür	<i>R. acetosella</i>

1.5.2.1. Bitkinin genel özellikleri

Rumex (Polygonaceae familyası) cinsine ait bitkiler dünya çapında yaygın şekilde dağılmış yaklaşık 200 tür içerir. Bazı bölgelerde *Rumex* türlerinin yaprakları, özellikle ekşi çorbalar, soslar ve salatalar şeklinde, yiyecek olarak tüketilir. Geleneksel tıpta ise mikrobiyal enfeksiyonlarla ilgili farklı hastalıkların, örneğin; dermatolojik şartlar, dizanteri, enterit ve askariasis tedavisi için kullanılırlar [127, 128].

R. acetosella, *R. alpinus*, *R. confertus*, *R. crispus* ve *R. obtusifolius* kabızlık, ishal, böbrek hastalıkları, şişkinlik için uygulanır ve kan temizleyici özellikleri vardır. Bunların yanı sıra yanık ve kanser tedavisinde de etkilidirler [129, 130].

Üst kısımları dallı salkımlar şeklinde olan, boyu yaklaşık 40 cm'ye ulaşan gövdeye sahip çok yıllık otsu bir bitkidir. Uzun köklere sahiptir. Nem oranı yüksek bölgelerde yaygın olarak yetişir. Yeşil sivri uçlu yaprakları vardır. Birçok türde çiçekler de yeşildir ancak *R. acetosella* Mayıs ve Ağustos ayları aralığında koyu pembe, kırmızı çiçekler verir [128, 131].



Şekil 1.23. *Rumex acetosella* bitkisi [128]

1.5.2.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması

Kuzukulağı, koyu pembe ve kırmızı renkte çiçek verdiği aylar olan mayıs ve ağustos ayları aralığında toplanır. Güneş ışığı almayacak şekilde gölgede ve standart oda koşullarında kurutulur. Çiçeklerin dökülmemesine dikkat edilerek, deneysel çalışmalarda kullanılabilecek karanlık ve nemsiz ortamda saklanır.

Kuzukulağı, Eskişehir'in Uludere mevkiinden, enlem: 39.977600, boylam: 30.328071 koordinatlarını içerisine alan meradan toplandı.

1.5.3. Top kekik (*Thymus sibthorpii*)

Tablo 1.12. *Thymus sibthorpii* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Eudicots
Takım	Mentheae
Alt takım	Menthinae
Familya	Lamiaceae
Alt familya	Nepetoideae
Cins	<i>Thymus</i>
Tür	<i>T. sibthorpii</i>

1.5.3.1. Bitkinin genel özellikleri

Thymus, 220 tür içeren taksonomik ve sistematik olarak karmaşık bir cinstir. Ayrıca *Thymus*, Lamiaceae familyasındaki türlerin sayısı bakımından en önemli cinslerden biridir. Akdeniz bölgesini kapsayan merkezi dağılım alanıyla tüm dünyaya yayılır ve yetiştirilir. *T. longicaulis*, *T. sibthorpii* ve *T. austriacus* Akdeniz bölgesine özgüdür. Çok yıllık otsu bir bitkidir. Dallanmış yapıdan oluşur ve küçük yeşil yapraklar bu dalların üzerinde yer alır. Mayıs ve ağustos ayları arasında mor renkte çiçeklenir.

Günümüzde yaygın olarak çay, baharat ve bitkisel ilaç olarak yetiştirilmektedir. Kekik yaprağı çayının dinlendirici ve uyku problemini önleyici özelliği vardır. Avrupa’da antienflamatuar, antiromatizmal, sindirim, antiülser ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı halk arasında yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra çeşitli farmakolojik çalışmalarla antioksidan, antiviral, antifungal aktiviteleri de kanıtlanmıştır. *Thymus* türleri, gastrointestinal hastalıklar, solunum yolu enfeksiyonları, cilt hastalıkları tedavisinde geleneksel bitkisel tıbbi ürün olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra balgam söktürücü ve idrar söktürücü özellikleri de bilinmektedir [132, 133].



Şekil 1.24. *Thymus sibthorpii* bitkisi [133]

1.5.3.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması

Top kekik, mor renkte çiçek verdiği aylar olan Mayıs ve Ağustos ayları aralığında toplanır. Güneş ışığı almayacak şekilde gölgede ve standart oda koşullarında kurutulur. Deneysel çalışmalarda kullanılabilecek karanlık ve nemsiz ortamda saklanır.

Top kekik, Eskişehir'in Uludere mevkiinden, enlem: 39.977600, boylam: 30.328071 koordinatlarını içerisine alan meradan toplandı.

1.5.4. Çiriş otu (*Asphodeline taurica*)

Tablo 1.13. *Asphodeline taurica* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Liliana
Takım	Asparagales
Familya	Asphodelaceae
Alt familya	Asphodeloideae
Cins	<i>Asphodeline</i>
Tür	<i>A. taurica</i>

1.5.4.1. Bitkinin genel özellikleri

Türkiye’de *Asphodeline* cinsinin yanı sıra *Asphodeline* ve *Eremurus* cinsleri de çiriş adıyla bilinir. Çünkü bu cinslerde yer alan türler birbirine çok benzerdir. Bu yüzden zaman zaman isimleri ve özellikleri karışabilir. *Asphodeline*, dünyada toplam 14 türe sahiptir ve bu türlerden bazıları Türkiye’de, özellikle İç Anadolu dağlarında ve bozkırlarında bol miktarda bulunur. Çok sayıda endemizm olması nedeniyle İç Anadolu ve çevresinin cinsin kökeninin merkezi olduğu düşünülmektedir. Bu bölgelerde *Asphodeline* cinsinin türlerinin tıbbi amaçlı kullanımları yaygındır. Çeşitli türlerin yapraklarından elde edilen suyun kulak ağrısını geçirmede etkisi vardır. Köklerin yakılması sonucu oluşan kömür, derideki sulu yaraları kurutmak için kullanılır. Bazı bölgelerde ise genç meyveler ve tohumları suda kaynatılarak basur tedavisinde kullanılır. Literatürde *A. taurica* türü ile ilgili çok fazla bilgi yer almamaktadır [134, 135].

Kısa rizomlu, çok yıllık bir bitkidir. Boyu 80 cm’e kadar uzayabilen dik ve sağlam gövdeye sahiptir. Üst kısımda beyaz çiçekler yer alır. Alt kısımda ise boydan boya, ince ve uzun şeritler halinde yeşil iğnemsî yaprakları vardır. Mayıs ve haziran aylarında çiçeklenir [136].



Şekil 1.25. *Asphodeline taurica* bitkisi [136]

1.5.4.2. Bitkinin toplanması ve kurutulması

Çiriş otu, mayıs ve haziran aylarında toplanır. Güneş ışığı almayacak şekilde gölgede ve standart oda koşullarında kurutulur. Deneysel çalışmalarda kullanılabilecek karanlık ve nemsiz ortamda saklanır.

Çiriş otu, Eskişehir'in Uludere mevkiinden, enlem: 39.454357, boylam: 30.614068 koordinatlarını içersine alan meradan toplandı.

1.6. Çalışmanın Amacı

Oksidatif stresteki serbest radikal kaynaklı hasar, nörodejeneratif koşullar (Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz) amfizem, kardiyovasküler ve enflamatuvar hastalıklar, katarakt ve kanser gibi birçok kronik sağlık probleminin patogeneze ve patofizyolojisine katkıda bulunduğu doğrulanmıştır. Oksidatif stresin kaynak veya sonuç olarak 100'den fazla hastalıkla korelasyonu olduğu görülmüştür. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif bozunmanın geri dönüşümsüz bir ilerlemesi de, fizyolojik fonksiyonların bozulmasından, hastalık insidansının arttırılmasından ve yaşam ömrünün azaltılmasından oluşan, yaşlanma biyolojisinin durumu üzerindeki olumsuz etkisini ortaya koyar [137].

Serbest radikaller normal hücresel fonksiyon sırasında üretilir ve tüm canlıların doğal fizyolojik sürecinin bir parçasıdır. Yüksek reaktivite nedeniyle, serbest radikaller, lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyomoleküllere zarar verebilir. Lipitler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın ana hedefleridir. Lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığı ve geçirgenliğini değiştirerek hücre zarının zarar görmesine neden olabilir. Serbest radikaller ayrıca sinyal iletimi ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere önemli fizyolojik rol oynar, ancak üretilen serbest radikallerin büyük çoğunluğu, optimal sağlık için vücudun antioksidan savunması tarafından etkisizleştirilmelidir [112].

Vücudun iki geniş kategori altında sınıflandırılan birçok antioksidanı vardır: suda çözünür ve yağda çözünür. C vitamini, glutatyon, lipoik asit ve ürik asit gibi suda çözünür antioksidanlar, insan kanında mevcut ana antioksidanlardır. Karotenler, E vitamini gibi yağda çözünen antioksidanlar ve koenzim Q10, hem kanda hem de hücrelerde bulunabilir. Ek olarak, birkaç enzim ayrıca antioksidanlar, en önemlisi süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar olarak da işlev görür [112].

Yenilebilir bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan flavonoidler ve kateşinler gibi fenolik ve polifenolik bileşikler, güçlü antioksidan aktivite sergiler. Yapılan çalışmaların büyük bir bölümü, bitki içeriklerinin serbest radikalleri temizlemede, hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde faydalı etkilerinin olduğunu belgelemiştir. Bitki içeriğinde bulunan çeşitli etken maddeler *in vitro* ve *in vivo* oksidatif strese karşı kırmızı kan hücresi direncini arttırır. Süperoksit ve hidroksil radikallerini etkili biçimde temizler ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidatif modifikasyonunu önler. Koroner kalp hastalığı ve hipertansiyon tedavisi için yararlıdır. Aynı zamanda toplam kolesterol ve

malondialdehitin serum konsantrasyonlarını azaltır ve insanlarda yüksek yoğunluklu lipoprotein serum konsantrasyonlarını artırır. α -karoten, β -Karoten, γ -karoten ve β -kriptoksantin gibi diğer karotenoidler, bitki kökenli güçlü antioksidanlardır [138].

Yukarıda vermiş olduğumuz bilgiler doğrultusunda koton alıcı, kuzukulağı, top kekik ve çiriş otu bitkilerinin fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi belirlenerek, bu bitkilerin insan serumundan saflaştırdığımız PON1 izoenziminin aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

PON'ların arasında en çok çalışılanı PON1, karaciğerde sentezlenen ve ağırlıklı olarak yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle (HDL) ilişkili bulunan, yaklaşık 43-45kDa molekül kütlesine sahip glikoproteindir. PON1'in membranlar arasında transferini ve birçok fare dokusunda PON1'in lokalizasyonunu gösteren önceki sonuçlar, PON1'in karaciğerden HDL'ler yoluyla, aktivitesinin gerekli olduğu dokulara aktarıldığını göstermiştir. PON1, OP'lerden aromatik karboksilik asit esterlerine, çekirdek algılayıcı sinyal moleküllerine (N-açıl homoserin lakton) ve lipo-laktonlara kadar geniş bir yelpazedeki substratları hidrolize edebilen oldukça hassas bir Ca^{2+} bağımlı metalo enzimdir [89, 97].

Önceki çalışmalar PON'ların uyguladığı fizyo-patolojik rolleri göstermiş olsa da, fizyolojik substratları henüz bilinmemektedir. PON1, paraokson gibi organofosfatlar dahil olmak üzere birçok organik substratı *in vitro* hidrolize edebilir, ancak birincil aktivitesi laktonaz gibi görünmektedir. Laktonaz aktivitesi, PON2 ve PON3 tarafından da gerçekleştirilir. PON aktivitelerinin değerlendirilmesine yönelik spektrofotometrik analizler, sırasıyla PON'ların paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerini veren paraokson, fenil asetat ve dihidrokumarini hidrolize etme kabiliyetlerine dayanmaktadır. PON3 ayrıca statinleri hidrolize edebilir ve statinaz aktivitesi substratlar olarak statinler (simvastatin veya lovastatin gibi) kullanılarak değerlendirilebilir. Ayrıca tüm saflaştırılmış PON'lar *in vitro* açıl-homoserin laktonları hidrolize eder. Açıl-homoserin, çeşitli patojenik bakterilerde, bakteri çoğunluğunu algılama sinyallerinde rol oynar, virülans faktörlerinin ekspresyonunu düzenler ve bir konakçı inflamatuvar yanıtını indükler [39, 43].

Paraoksonazlar (PON1, PON2 ve PON3), yüksek yapısal homolojiye sahip bir enzim ailesidir. Hepsi de laktonaz aktivitesine sahiptir; lipoproteinlerde ve hücrelerde lipid peroksidleri bozar. Bu nedenle, oksidasyon ve iltihaplanmaya karşı korunmada rol oynarlar. Bulaşıcı hastalıklar sıklıkla oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtla ilişkilidir. Enfeksiyon ve iltihaplanma, konakçıda akut faz cevabı olarak bilinen bir reaksiyon kademesini tetikler. Bu yanıt serum PON1 aktivitesinde bir düşüş dahil olmak üzere, serum proteinlerinde ve lipoproteinlerde meydana gelen çarpıcı değişikliklerle ilişkilidir. Bu değişikliklerin, kardiyovasküler hastalıklar için artan risk ve antibiyotiğe dirençli bakteriyel biyofilm oluşumuna karşı bozulmuş bir koruma dahil olmak üzere enfekte olmuş hasta için klinik sonuçları vardır. Çeşitli çalışmalar, enfeksiyon sürecinin

biyobelirteçleri olarak serum PON1 ölçümünün değerini araştırmıştır. Düşük serum PON1 aktiviteleri, ağır sepsisli hastalarda hayatta kalma düşüklüğü ile ilişkilidir. Ek olarak, ön çalışmalar serum PON1 konsantrasyonunun ve/veya enzim aktivitesinin kalıcı bir santral venöz kateter bulunan hastalarda akut eş zamanlı enfeksiyonun belirteçleri olarak yararlı olabileceğini göstermektedir [139].

Obezite ile ilişkili metabolik değişiklikler, mineral düzensizliği içerir. Temel iz elementler, çok sayıda hücresel süreçte ilgili bir işlevi olan ve metabolik enzimlerin doğru işleyişinde çoklu rollere sahip besinlerdir. PON1, şişmanlıkta tehlikeye giren bir antioksidan ve antienflamatuvar bir enzimdir.

Morbid obez kadınlarda iz elementlerdeki potansiyel değişiklikler, serum PON1 aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir. 41 morbid obez kadın ve 51 kişilik kontrol grubu ile yapılan çalışmada, 30 elementin serum konsantrasyonları, PON1 paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri, PON1 konsantrasyonları ölçüldü. Obez kadınlarda As, Ba, Cu, Ca, Fe, Mg, Na, Se, Sr ve Zn düzeylerinde önemli değişiklikler gözlemlendi. En önemli değişiklikler, diabetes mellitus ile önemli ölçüde ilişkili olan As, Sr ve Mg konsantrasyonlarında gözlemlendi. As, Ca, Cr, Cu, Mg ve Se elementlerinin serum PON1 değerleri ile anlamlı korelasyon vardır. Mevcut sonuçlar, çok sayıda iz elementin alımının veya depolanmasının artmasının obeziteye bağlı ek hastalıkların ve metabolik değişikliklere neden olan faktörler olabileceği ihtimalini arttırmaktadır [140].

Sağlıklı bir diyetle bağlılık, çeşitli insan hastalıklarının önlenmesinde yerleşik bir role sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek miktarda meyve ve sebze alımının, çeşitli kanser türlerinin riskiyle ters ilişkili olduğunu göstermiştir. Oksidatif stres ve inflamasyon, kanser gelişiminde ve kemoterapinin prognozunu belirlemede önemli faktörler olarak kabul edilir. Kanser hastalarında PON1 aktivitesindeki azalmayla, lipid ve proteinlere karşı oksidatif stres markerlarında bir artış olduğu daha önce gösterilmiştir. Bu nedenle, PON1 aktivitesinin veya ekspresyonunun artmasının oksidatif stres ile ilişkili hastalıkları önlemek için yararlı bir yaklaşım olabileceği öne sürülmüştür. Yağda çözünen ve suda çözünen vitaminlerin PON1 aktivitesi üzerine etkisi konusunda çelişkili çalışmalar yayınlanmıştır. Nüfusa dayalı çalışmalar negatif bir korelasyon göstermiştir, ancak pozitif bir korelasyonun kanıtı da vardır [82].

PON1, kanserojen serbest radikallerin yok edilmesinde ve oksidatif dengeyi korumak için temizleme mekanizmalarında rol oynayan bir lipolaktonazdır. Yapılan bu çalışmanın amacı, kanserli hastalarda serum PON1 aktivitesindeki olası değişiklikleri

değerlendirmektir. Kanserli hastalarda PON1 aktivitesinde azalma olduğunu bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu, hücre proliferasyonunda potansiyel etkileri, genetik instabilitenin desteklenmesi ve kemoterapiye hücresel duyarlılıktaki değişiklikler ile oksidatif strese karşı savunma kabiliyeti ile yorumlanabilir [141].

PON'lar, antioksidan aktivite, anti-enflamatuar etki, HDL işlevini koruma, kolesterol akışının uyarılması, anti-apoptoz, anti-tromboz ve anti-adezyonu içeren sayısız ateroprotektif özelliğe sahiptir. PON genetik polimorfizmleri, ateroskleroz ile ilgili hastalıklardan korunmaya katkıda bulunur. PON kümesinin parlak antiaterojenik aktivitesi, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için umut verici bir hedef haline getirmektedir. PON1, oksLDL ve çeşitli fosfolipid peroksidasyon katkı maddelerini, güçlü bir antioksidan ve sitoprotektif fonksiyon göstererek parçalayabilir. PON1'in ateroprotektif özelliklerini destekleyen kanıtlar, PON1 eksikliği bulunan fareleri içeren deneylerden gelir. PON1 eksikliği bulunan farelerden türetilen lipoproteinler, normal hayvanlardan izole edilen lipoproteinlerle karşılaştırıldığında oksidasyona karşı daha savunmasız olduğu gözlemlenmiştir. *In vivo* deneylerin sonucunda, PON1 eksikliği olan farelerde HDL, LDL'yi oksidasyondan koruma yeteneğini kaybettiği tespit edilmiştir [142].

PON'lar antioksidan savunma ve hücre davranışının düzenlenmesi ile ilgili çok işlevli enzimlerdir. Çeşitli çalışmalar, farklı tümör türlerinden etkilenen hastalarda PON1 aktivitelerinde bir düşüş olduğunu göstermiştir. Tersine, PON2 ve PON3 ile ilgili çalışmalar bir artış göstermiştir. Aşırı eksprese edilmiş PON2 veya PON3'ün dengelenmesi, kemo-duyarlılığı ve kemoterapinin başarısını arttırmanın olası bir yolu olarak önerilmiştir. PON ekspresyonuna aracılık eden sinyal iletim yolları incelenmiştir. İlaçlar ve kemoterapötikler için potansiyel hedefleri temsil etmektedir. Fitobesinlerin kanserde kemopreventif rolleri nedeniyle kullanımı tartışılmaktadır. Ayrıca, PON'ların aktivitesi kardiyovasküler hastalıklara ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruyucu olabilir [82].

İnsülin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar. Son zamanlarda, PON1'in *in vitro* glukoz taşıyıcı-4 (GLUT-4) ekspresyonunu teşvik ederek insülin direncini azaltabildiği bildirilmektedir. PON1'deki tek nükleotid polimorfizmi, enzim aktivitesi ve konsantrasyonundaki değişkenlik ile ilişkilidir. Buna dayanarak, PON1 (Q192R ve L55M) polimorfizmleri ile yetişkin Güney Hint popülasyonunda insülin direnci gelişme riski arasındaki ilişki araştırılmıştır. QR/RR

ve LM/MM genotiplerinin dağılımı, tip 2 diyabet hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. PON1 (Q192R ve L55M) polimorfizmleri, patojenez ve insülin direncinin duyarlılığında önemli bir rol oynayabilir, bu nedenle Güney Hint popülasyonunda tip 2 diyabet gelişimine yol açar [143].

Epilepsi, çocukluk ve ergenlikte en sık görülen kronik nörolojik hastalıktır. Yapılan çalışmalarda, dirençli epilepsili çocuklarda paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerini ve oksidatif durum parametreleri araştırılmıştır. Epilepsili 42 kişiden ve 35 sağlıklı denekten oluşan kontrol grubunu içeren bir çalışmada serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri yanı sıra lipid hidroperoksit seviyeleri de belirlenmiştir. Tüm paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri, dirençli epilepsili deneklerinde kontrollere göre anlamlı derecede düşüken, lipid hidroperoksit seviyeleri anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri azalmış ve epilepsili hastalarda lipid hidroperoksit seviyesi artmıştır. Bu çalışmanın sonucu, dirençli epilepsi deneklerinin ateroskleroz gelişimine daha yatkın olabileceğini göstermiştir [144].

Epilepsi sıklıkla uzun vadeli antiepileptik ilaç tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Yapılan bir çalışmada epilepsi tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar seçilmiştir. Valproik asit, gabapentin, primidon, fenitoin ve levetirasetam gibi bazı antiepileptik ilaçların, insan serum PON1 üzerindeki *in vitro* inhibisyon rolüne odaklanılmıştır. İlaçlar, *in vitro* PON1 aktivitesinde azalmış olduğunu gösteren çeşitli konsantrasyonlarda test edilmiştir. Gabapentin, diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında etkili inhibitör aktivite sergilemiştir. Tüm bileşiklerin inhibisyon mekanizmalarının yarışmalı olmadığı tespit edilmiştir [145].

Sigara içmek, erken ateroskleroz sıklığının artması ile ilişkilidir. Sigara dumanının etki mekanizması hakkında moleküler düzeyde çok az bilgi mevcuttur. Son çalışmalar paraoksonazın (PON), düşük yoğunluklu lipoproteini oksidasyona karşı koruduğunu göstermiştir. Sigara dumanı ekstraktının insan plazma paraoksonaz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmaktadır. Bu konu ile ilgili bir çalışmada paraoksonazın aktivitesinin, sigara dumanı ekstraktı tarafından doza ve zamana bağlı olarak inhibe edildiği ve yine PON aktivitesinin sigara dumanı ekstraktı tarafından inhibisyonunun, glutatyon veya N-asetil sistein ilavesiyle tersine çevrildiği bulunmuştur [146].

Enzim ile ilgili yapılan bir çalışmada, palonosetron hidroklorür, bevacizumab ve siklofosfamid ilaçlarının *in vitro* koşullarda insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. İnhibisyon çalışmaları, palonosetron hidroklorür,

bevasizumab ve siklofosfamidin paraoksonaz aktivitesi üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlaçların inhibisyon oranları karşılaştırıldığında, palonosetron hidroklorürün maksimum inhibisyon oranına sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, ilaçların inhibisyon mekanizmalarının Lineweaver-Burk eğrileri tarafından yarışmalı olmadığı tespit edilmiştir [147].

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) hem zararlı hem de faydalı türler olarak ikili rol oynadığı için iyi bilinmektedir. ROS ve RNS normalde sırasıyla nitrik oksit sentaz ve NAD(P)H oksidaz izoformları gibi sıkı düzenlenmiş enzimler tarafından üretilir. Serbest radikallerin potansiyel biyolojik hasara neden olan zararlı etkisine oksidatif stres ve nitrosatif stres denir. Biyolojik sistemlerde bu olaylar, bir tarafta aşırı ROS/RNS üretimi ve diğer tarafta enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların eksikliği olduğunda meydana gelir. Başka bir deyişle, oksidatif stres, oksijen kullanan metabolik reaksiyonlardan kaynaklanır ve canlı organizmalardaki pro-oksidan/antioksidan reaksiyonların denge durumunda bir bozukluğu temsil eder. Aşırı ROS, normal işlevlerini engelleyen hücresel lipitlere, proteinlere veya DNA'ya zarar verebilir. Bu nedenle, oksidatif stres yaşlanma sürecinin yanı sıra bir dizi hastalığa da neden olmuştur. Serbest radikallerin faydalı ve zararlı etkileri arasındaki hassas denge canlı organizmaların çok önemli bir yönüdür ve “redoks regülasyonu” adı verilen mekanizmalarla sağlanır. “Redoks regülasyonu” işlemi canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve redoks durumunu *in vivo* olarak kontrol ederek “redoks homeostazını” korur [119].

Antioksidanların insan sağlığının korunmasındaki olumlu etkisi, son on yılda dünya genelinde birçok bilim insanını meşgul eden önemli bir konu haline gelmiştir. Son birkaç yılda, antioksidanlar beslenme dünyasının vazgeçilmezleri haline gelmiştir. Antioksidanlar, Alzheimer hastalığı, kanser, kalp hastalığı gibi durumlara yol açabilen ve ayrıca kronik enflamasyonla bağlantılı olan oksidatif hücre hasarına karşı koruma kabiliyetleri bakımından önemlidir [148].

Düşük konsantrasyonda bile oksidatif süreci önemli ölçüde inhibe eden veya geciktiren, sıklıkla kendi kendilerini okside eden maddeler olarak tanımlanmaktadır. Son raporlar, serbest radikalleri nötralize etmek ve redoks dengesini koruyarak vücudu serbest radikallerden korumak için çeşitli endojen ve eksojen antioksidanların kullanıldığını göstermektedir [149]. Singh ve diğerleri, antioksidanların metabolik yollarda hayati bir rol oynadıklarını ve hücreleri koruduklarını belirtmişlerdir [150].

Bununla birlikte, son zamanlardaki çelişkili kanıtlar bilim adamlarını, patolojik durumlarda ortaya çıkan serbest radikal reaksiyonlarında antioksidanların ve pro-oksidanların rolünü araştırmak için daha derine inmeye zorladı. Bu patolojik durumlar; Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz, amiotrofik lateral skleroz, hafıza kaybı, depresyon gibi nörodejeneratif bozuklukları ve ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, kalp hipertrofisi, hipertansiyon, şok, travma gibi kardiyovasküler hastalıkları içerir [105].

1800'lerden bu yana, *Crataegus* içeren doğal sağlık ürünleri Kuzey Amerika'da hipertansiyon, anjina, aritmi ve konjestif kalp yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kızılderili kabileleri, gastrointestinal rahatsızlıkları tedavi etmek için *Crataegus* kullanmıştır ve meyvesini yiyecek olarak tüketmişlerdir. Ayrıca, Avrupa ve Çin'de yemek için ve geleneksel tıpta uzun bir kullanım geçmişine sahiptir [151].

Avrupa'da, bitkinin meyvesi, yaprakları ve çiçekleri geleneksel olarak antispazmodik, kardiyotonik, hipotansif ve anti- aterosklerotik etkileri nedeniyle kalp problemlerinin tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde bitki, esas olarak kardiyovasküler hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Geleneksel Akdeniz tıbbında kanser, diyabet, öksürük, grip, astım, mide ağrısı, romatizma ağrısı, nefrit ve hemoroitler için terapötik bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [125].

Rumex cinsinde yaklaşık 200 tür olmasına rağmen, fitokimyasal ve farmakolojik çalışmaların çoğu 50 türe kadar yapılmıştır. Bitkinin hava kısımları, yaprakları ve kökleri sebze olarak kullanılır. Ayrıca, hafif diyabet, kabızlık, enfeksiyon, ishal, ödem, sarılık ve bir antihipertansif, idrar söktürücü, analjezik, cilt, karaciğer ve safra kesesi bozuklukları ve iltihaplanma gibi sağlık bozukluklarının tedavisinde kullanılır. Bu cinsle ilgili birçok fitokimyasal araştırma, *Rumex* türlerinin antrakınonlar, naftalinler, flavonoidler, triterpenler, karotenoidler ve fenolik asitler bakımından zengin olduğunu doğrulamıştır. Bazı türlerde yüksek seviyelerde oksalik asidin bulunması nedeniyle bitkinin çok miktarda tüketilmesi halinde toksisiteye (böbrek taşı) neden olabileceği dikkat çekmektedir [128].

Thymus, 220 tür içeren taksonomik ve sistematik olarak karmaşık bir cinstir. Bu cins, Akdeniz bölgesini kapsayan merkezi dağılım alanıyla tüm dünyaya dağılır ve yetiştirilir. *Thymus* türleri, mutfakta yemeklerde kullanılmasının yanı sıra, gastrointestinal rahatsızlıklarda, solunum yolu enfeksiyonlarında, cilt rahatsızlıklarını tedavi etmede geleneksel bir bitkisel tıbbi ürün olarak yaygın şekilde kullanılır. Çeşitli

farmakolojik çalışmalarla, antioksidan, antienflamatuar, spazmolitik, antitusif, balgam sktrc, antibakteriyel, antifungal, antiviral aktiviteleri kanıtlamıştır. *Thymus* türlerinin sağlığı teşvik eden özellikleri fenolik bileşiklerin, triterpenik asitlerin ve özellikle esansiyel yağların varlığına bağlanmıştır [133].

Asphodeline cinsi, Akdeniz bölgesinde yaygın olan 14 tür içerir [134]. Türkiye, *Asphodeline* cinsinin ana kökeni sayılabilir. Türk halk tıbbında hem şıfalı bitkiler hem de insan diyetinde yiyecek olarak kullanılırlar [152]. Örneğin; *A. damascena* subsp. *damascena* ve *A. tenuior* subsp. *Tenuiflora* Anadolu'da geleneksel iyileşme sistemindeki lezyon ve siğillerin tedavisinde kullanılırlar. Ek olarak, kulak ağrıları ve hemoroitler *A. cilicica* ve *A. globifera* türleri kullanılarak iyileştirilir. Bazı türlerin yaprakları da Türkiye'de birçok yerde salata sebzesi olarak tüketilmektedir [153, 154].

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

2-Merkaptoetanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
ABTS	: Sigma-Aldrich, Almanya
Akrilamid-Bisakrilamid	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum asetat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum persülfat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum sülfat	: Merck, Almanya
Amonyum tiyosiyanat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetik asit	: VWR Chemicals, Amerika
Aseton	: Carlo Erba, Fransa
Bakır-II-klorür	: Alfa Aesar, Amerika
BHA	: Sigma-Aldrich, Almanya
BHT	: Sigma-Aldrich, Almanya
Bipiridil	: Sigma-Aldrich, Almanya
Bromtimol mavisi	: Sigma-Aldrich, Almanya
Coomassie brilliant blue G250	: Sigma-Aldrich, Almanya
Coomassie brilliant blue R250	: Sigma-Aldrich, Almanya
DEAE Sephadex A-50	: GE Healthcare, Amerika
Demir-III-klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Demir-II-klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Demir-II-sülfat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	: Sigma-Aldrich, Almanya

Disodyum karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Diyaliz torbası	: 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
Kalsiyum klorür	: Honeywell Fluka, Amerika
Linoleik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metiyonin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Moleküler ağırlık marker	: Sigma-Aldrich, Almanya
Monosodyum fosfat	: Acros Organics, Amerika
NaOH	: Sigma-Aldrich, Almanya
Neokuprin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Nitroblue tetrazolium	: Sigma-Aldrich, Almanya
Paraokson	: Sigma-Aldrich, Almanya

Potasyum ferrisiyanür	: Honeywell Fluka, Amerika
Potasyum persülfat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Riboflavin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sephadex G-100	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum azit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Acros Organics, Amerika
Sodyum hidroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
TCA	: Sigma-Aldrich, Almanya
TEMED	: 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
Gradient mikseri	: Sigma-Aldrich
Hassas terazi	: Precisa XB 220A, İsviçre
LC/MS-IT-TOF	: Shimadzu, 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 evoparatör	: IKA RV 3 V ROTARY EVAPORATÖR, Almanya
Saf su cihazı	: Miliporte TANK-PE-030, Amerika
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 326 K, Almanya
Su banyosu	: JSR JSEB-22T, Japonya
UV-VIS spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208, Japonya
Vakum pompası	: Millipore WP6222050, Amerika
Vorteks	: Vortex-Genie 2, Amerika

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

3.3.1. Aktivite ölçümü için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

➤ **1 mM CaCl₂ içeren 50 mM glisin / NaOH (pH 10,5) tampon çözeltisi:**

1,876 g glisin ve 0,055 g CaCl₂ tartılarak 450 mL distile suda çözüldü. 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 10,5 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

➤ **Substrat çözeltisi:**

18 µL paraokson alınarak 500 µL asetonda iyice çözünmesi sağlandı. Karışım, 25 mL distile suya damla damla ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı.

3.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesinde ve diyalizde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

➤ **Amonyum sülfat çöktürmesi için 100 mM Na-fosfat (pH 7,0) tampon çözeltisi:**

5,999 g NaH₂PO₄ tartılarak 450 mL distile suda çözüldü. 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

➤ **Diyaliz için 1 mM Na-fosfat (pH 7,0) tampon çözeltisi:**

0,0599 g NaH₂PO₄ tartılarak 450 mL distile suda çözüldü. 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3.3.3. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

➤ **100 mM Na-fosfat (pH 7,0) tampon çözeltisi:**

5,999 g NaH₂PO₄ tartılarak 450 mL distile suda çözüldü. 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

➤ **0,5 N HCl çözeltisi:**

d: 1,19 g/mL, %37'lik HCl çözeltisinden 8,281 mL alındı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı.

➤ **0,5 N NaOH çözeltisi:**

4 g NaOH tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı.

➤ **1,5 M NaCl çözeltisi:**

26,298 g NaCl tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 300 mL'ye tamamlandı.

3.3.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

➤ **100 mM Na-fosfat (pH 7,0) tampon çözeltisi:**

5,999 g NaH_2PO_4 tartılarak 450 mL distile suda çözöldü. 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3.3.5. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

➤ **Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi:**

Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden 25 mg tartıldı. 12,5 mL %96'lık etanolde çözöldü. Bu çözeltinin üzerine %86'lık 25 mL fosforik asit eklendi. Distile su ilavesiyle toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **Standart serum albumin çözeltisi:**

1 mg standart serum albumin tartıldı. 1 mL distile suda çözöldü ve 1 mg/mL olacak şekilde stok hazırlandı.

3.3.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılan çözeltilerin ve jellerin hazırlanması:

➤ Tris-HCl (1 M, pH 8,8) tampon çözeltisi:

6,05 g Tris tartılarak 40 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 8,8 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

➤ Tris-HCl (1 M, pH 6,8) tampon çözeltisi:

6,05 g Tris tartılarak 40 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 6,8 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

➤ SDS çözeltisi (%10'luk):

2 g SDS tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

➤ TEMED çözeltisi (%5'lik):

1 g TEMED tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı.

➤ PER çözeltisi (%1,5'lik):

0,30 g PER tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı. Çözelti taze hazırlandı ve fazla bekletilmeden kullanıldı.

➤ Akrilamid (%30)-Bisakrilamid (%0,8) çözeltisi:

14,5 g akrilamid ve 0,5 g bisakrilamid tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

➤ Yürütme tampon çözeltisi:

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin tartılarak 450 mL distile suda çözüldü. %10'luk SDS çözeltisinden 5 mL eklendi. 1 M'lık HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 8,3 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

➤ **Numune tampon çözeltisi:**

Tris-HCl (1 M, pH 6,8) tamponundan 0,5 mL, %10'luk SDS çözeltisinden 1 mL, %100'lük gliserinden 1 mL, %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisinden 1 mL alındı ve 6,5 mL distile su ilavesiyle toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı. Son olarak her 950 µL tampon başına 50 µL β-merkaptoetanol ilave edildi.

➤ **Sabitleştirme çözeltisi:**

%99,5'lik izopropanolden 50 mL, %10'luk TCA'dan 10 mL ve distile sudan 40 mL alınarak 100 mL hacminde hazırlandı.

➤ **Ayırma jeli:**

Tris-HCl (1 M, pH 8,8) tamponundan 3,75 mL, %30 akrilamid-%0,8 BIS çözeltisinden 3,3 mL, %10'luk SDS çözeltisinden 0,1 mL, %0,5'lik TEMED çözeltisinden 0,2 mL, %1,5'lik PER çözeltisinden 0,15 mL ve distile sudan 2,35 mL alınarak hazırlandı.

➤ **Yığma jeli:**

Tris-HCl (1 M, pH 6,8) tamponundan 0,31 mL, %30 akrilamid-%0,8 BIS çözeltisinden 0,3325 mL, %10'luk SDS çözeltisinden 0,025 mL, %0,5'lik TEMED çözeltisinden 0,025 mL, %1,5'lik PER çözeltisinden 0,05 mL ve distile sudan 1,84 mL alınarak hazırlandı.

➤ **Brom timol mavisi çözeltisi (%0,04'lük):**

0,1 g brom timol mavisi tartılarak 16 mL 0,01 M'lık NaOH içinde çözüldü. Distile su ilavesiyle toplam hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **Jelin boyanma çözeltisi:**

%99,7'lik metanolden 100 mL, %100'lük asetik asitten 20 mL ve distile sudan 80 mL alınarak 200 mL hacminde hazırlandı. Karışım içerisinde 0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi çözüldü.

➤ **Jelin yıkanma çözeltisi:**

%99,7'lik metanolden 100 mL, %100'lük asetik asitten 20 mL ve distile sudan 80 mL alınarak 200 mL hacminde hazırlandı.

3.3.7. Bitki ekstralarının stok çözeltilerinin hazırlanması:

Antioksidan ve enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan sulu ve etanollü bitki ekstralarının stok çözeltileri 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda alınarak çalışmalara devam edildi.

3.3.8. Antioksidan aktivite tayinlerinde yöntemlere göre kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

➤ **Demir indirgeme kuvveti tayini (Fe^{+3} - Fe^{+2}) için çözeltiler:**

Fosfat Tamponu (0,2 M, pH 6,6): NaH_2PO_4 'dan 2,399 g tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 6,6 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Potasyum Ferrisiyanür Çözeltisi: 1 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%10'luk Trikloroasetik asit çözeltisi: 10 g TCA tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik Demir-III-klorür çözeltisi: 0,170 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **FRAP metodu için çözeltiler:**

Asetat tamponu (0,3 M, pH 3,6): 2,461 g NaCH_3COO tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 3,6 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

40 mM HCl çözeltisi: %37'lik HCl'den 0,334 mL alınarak az miktarda distile suya eklendi. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM TPTZ çözeltisi: Tris piridil triazin'den 0,312 g tartılarak, önceden hazırlanan 40 mM'lık 100 mL HCl çözeltisi içinde çözöldü.

20 mM Demir-III-klorür çözeltisi: 0,540 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

FRAP Reaktifi: Sırasıyla 0,3 M asetat tamponundan, 10 mM TPTZ çözeltisinden ve 20 mM demir-III-klorür çözeltisinden 10:1:1 oranlarında kullanılarak hazırlandı.

➤ **CUPRAC metodu için çözeltiler:**

0,01 M Bakır-II-klorür: 0,1345 g CuCl_2 tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

$7,5 \cdot 10^{-3}$ M Neokuprin: 0,1562 g Neokuprin tartılarak az miktarda etil alkolde çözünmesi sağlandı. Tekrar etil alkol ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1 M Amonyum asetat tamponu: 7,7082 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tartılarak 80 mL distile suda çözöldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 6,5 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **ABTS radikali giderme aktivitesi tayini için çözeltiler:**

Fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,4): 1,4196 g Na_2HPO_4 tartılarak 80 mL distile suda çözöldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,2 mM ABTS çözeltisi: 11 mg ABTS tartılarak pH'ı 7,4 olan 0,1 M'lık fosfat tamponu içerisinde çözöldü. Bir gece süresince karanlık ortamda, manyetik karıştırıcı eşliğinde tam çözünme gerçekleşene kadar karıştırıldı.

2,45 mM Potasyum persülfat çözeltisi: 66,2 mg $K_2O_8S_2$ tartılarak pH'ı 7,4 olan 0,1 M'lık az miktarda fosfat tamponu içerisinde çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için çözelti:**

10^{-3} M DPPH çözeltisi: 39,4 mg DPPH tartılarak az miktarda etil alkolde çözünmesi sağlandı. Tekrar etil alkol ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **DMPD ($DMPD^{*+}$) radikali giderme aktivitesi tayini için çözeltiler:**

0,1 M DMPD çözeltisi: 209 mg DMPD tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

Sodyum asetat tamponu (0,1 M, pH 5,25): 0,8203 g $NaCH_3COO$ tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 5,25 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,05 M Demir-III-klorür çözeltisi: 0,811 g $FeCl_3$ tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,001 M N-N'-Dimetil-p-fenilendiamin radikalinin ($DMPD^{*+}$) hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltisinden 1 mL alınarak 100 mL'lik sodyum asetat (0,1 M, pH 5,25) tamponuna eklendi. Üzerine 0,2 mL 0,05 M'lık $FeCl_3$ çözeltisi ilave edilerek ve son hacim 101,2 mL oldu.

➤ **Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini için çözeltiler:**

Tris-HCl tamponu (0,1 M, pH 7,4): 1,2114 g Tris tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM Demir-II-sülfat çözeltisi: 55,60 mg $FeSO_4.7H_2O$ tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%2'lik Hidroklorik asit: %37'lik HCl'den 5,40 mL alınarak az miktarda distile suya eklendi. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%0,2'lik Bipiridil Çözeltisi: 0,2 g Bipiridil tartılarak 100 mL %2'lik HCl çözeltisi içine ilave edildi.

➤ **Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi tayini için çözeltiler:**

Fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8): 0,7098 g Na_2HPO_4 tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik HCl çözeltisi eklenerek pH'ı 7,8 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

$1,33 \cdot 10^{-5}$ M Riboflavin çözeltisi: 12 mg riboflavin tartılarak az miktarda fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8) içerisinde çözüldü. Tekrar fosfat tamponu ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

$4,46 \cdot 10^{-5}$ M Metiyonin çözeltisi: 0,665 mg metiyonin tartılarak az miktarda fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8) içerisinde çözüldü. Tekrar fosfat tamponu ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

$8,15 \cdot 10^{-8}$ M Nitroblue tetrazolium çözeltisi: 12,17 g NBT tartılarak az miktarda fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8) içerisinde çözüldü. Tekrar fosfat tamponu ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **Total fenolik bileşik miktar tayini için çözeltiler:**

Na_2CO_3 : 10 g Sodyum karbonat tartılarak 50 mL distile suda çözüldü.

Gallik asit: 1 mg/mL'lik stok hazırlandı. Gallik asit çözeltisi sırasıyla 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyon aralıklarına seyreltildi.

➤ **Total antioksidan aktivite tayini için çözeltiler:**

Fosfat tamponu (0,01 M, pH 7,4): 0,120 g NaH_2PO_4 tartılarak 80 mL distile suda çözüldü. 1 N'lik NaOH çözeltisi eklenerek pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%3,5'lik Hidroklorik asit: %37'lik HCl'den 9,459 mL alınarak az miktarda distile suya eklendi. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

20 mM Demir-II-klorür çözeltisi: 280,52 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$ tartılarak az miktarda %3,5'lik HCl içerisinde çözöldü. Tekrar %3,5'lik HCl ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%30'luk Amonyum tiyosiyanat çözeltisi: 30 g NH_4SCN tartılarak az miktarda distile suda çözünmesi sağlandı. Tekrar distile su ilavesiyle toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,017 M Linoleik asit emölsiyonu: 265 μL Linoleik asit, 50 mL fosfat tamponuna (0,01 M, pH 7,4) damla damla ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Emölgatör olarak; 90 mL tween-20, 140 mL fosfat tamponuna (0,01 M, pH 7,4) damla damla ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra bu iki çözelti birbirine karıştırıldı.

4. YÖNTEMLER

4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

➤ Bitkilerin sulu ekstraktları:

Bitkiler meradan toplandıktan sonra gölgede kurutuldu. Kurutulan bitkiler budama makası yardımıyla ufak ufak parçalandı. Her bitkiden 5'er gram tartılarak ayrı ayrı erlenlere alındı ve üzerine 1:10 oranında distile su ilave edildi. 24 saat süresince çalkalayıcıda çalkalandı ve süre bitiminde süzme işlemi yapıldı. Aynı işlem 3 gün tekrarlandı. Toplanan süzüntüler -20°C'de donduruldu ve son olarak liyofilizasyon işlemi uygulandı.

➤ Bitkilerin sulu ekstraktları:

Bitkiler meradan toplandıktan sonra gölgede kurutuldu. Kurutulan bitkiler budama makası yardımıyla ufak ufak parçalandı. Her bitkiden 5'er gram tartılarak ayrı ayrı erlenlere alındı ve üzerine 1:20 oranında etanol ilave edildi. 48 saat süresince çalkalayıcıda çalkalandı ve süre bitiminde süzme işlemi yapıldı. Süzüntüdeki etanol rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Kalan su -20°C'de donduruldu ve son olarak liyofilizasyon işlemi uygulandı.

4.2. Bitki Ekstrelerinin LC/MS-IT-TOF Cihazı ile İçerik Analizi

LC/MS-IT-TOF cihazı yardımıyla hem pozitif iyon modunda hem de negatif iyon modunda kütle spektrumlarına göre maddeler tespit edilebilir. Bu amaçla LCMS-IT-TOF, iyon tuzağının parçalanma gücünü, uçuş süresi kütle spektrometresinin yüksek çözünürlüğünü ve kütle hassasiyetini kullanarak maddeler hakkında hem kimyasal hem de yapısal bilgi edinmelerini sağlar [155].

4.3. Moleküler Modelleme (Docking) Çalışmaları

LC/MS-IT-TOF sonuçlarına göre tespit ettiğimiz maddeleri 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 etkileşimleri belirlendi. Protein Data Bank (PDB) sunucusundan PON1'in 3SRG kodlu X-ray kristal yapısı alındı. PON1 enzimi, docking analizi için Schrödinger yazılımının "protein hazırlama" modülünde optimize edildi. Moleküler

docking çalışmalarında, ligandların topolojilerinin tahmininde, PON1 enziminin substrat bağlanma bölgesinde Glide/XP docking protokolleri uygulandı [156].

4.4. İnsan Serumunu Temini

Deneysel çalışmalara başlamadan önce Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli onay alındı (Ek 1). Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi'nden insan serumu temin edildi. Serum +4°C'de muhafaza edilerek bekletilmeden deneysel çalışmalarda kullanıldı.

4.5. İnsan Serum PON1 Enzimi Aktivitesinin Belirlenmesi

25°C'da, pH'ı 10,5 olan ve 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM glisin/NaOH tampon çözeltisi içinde 1 mM paraoksonun substrat olarak kullanılmasıyla insan serum PON1 enzimin paraoksonaz aktivitesi belirlenir. PON1 enziminin paraokson substratı ile reaksiyon vermesi sonucu paranitrofenol oluşur. Paranitrofenolün 412 nm'de absorbansı ölçülerek PON1'in aktivitesi belirlenir [157].

Aktivite hesabında kullanılan formül aşağıda verilmiştir:

$$\frac{EU}{mL} = \frac{\Delta OD}{18,290} \times \frac{V_T}{V_E} \times 1000$$

EU/mL	: 1 mL'deki enzim ünitesi
ΔOD	: Bir dakikadaki absorbans değişimi
18,290	: Paranitrofenolün pH 10,5'deki molar ekstinksiyon katsayısı (M ⁻¹ cm ⁻¹)
V _T	: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi (mL)
V _E	: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi (mL)

4.6. İnsan Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Çalışmalar

➤ Amonyum sülfat çöktürmesi

Protein çözünürlüğü iyonlardan etkilenir. Düşük iyon konsantrasyonlarında, protein çözünürlüğü iyonik kuvvet ile birlikte artar. Bu olaya salting-in adı verilir. Çok yüksek iyon konsantrasyonlarında ise iyonik kuvvet arttıkça protein çözünürlüğü azalır. Bu olaya salting-out adı verilir. Salting-out işlemi, proteinleri yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünürlüklerine göre ayırmada kullanılabilir. Çok yüksek iyon

gücü, suda iyi çözünürlük, kolay bulunma ve düşük maliyet gibi nedenlerden dolayı amonyum sülfat kullanımı tercih edilir. NH_4^+ ve SO_4^{2-} 'nin proteinin yapısını stabilize ettiği gösterilmiştir [1, 158].

Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılacak olan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarının hesaplandığı formül aşağıda verilmiştir:

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

g : Katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı

V : Enzim numunesinin hacmi (mL)

S_1 : Çözeltildeki amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olacak şekilde yazılır)

S_2 : İstenilen amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olacak şekilde yazılır)

Öncelikle serumda aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı. 25 mL serum alındı. %0-60 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapmak için gerekli olan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı formülden hesaplandı. Tartılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, buz banyosu içerisinde bulunan seruma azar azar eklenerek, manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaşça karıştırıldı ve çözünmesi sağlandı. $+4^\circ\text{C}$ 'de $12000 \times g$ 'de 15 dakika sanrifüj edildi. Süpernatant ve çökelek için aktivite ölçümü yapıldı. %60-80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapmak için gerekli olan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı formülden hesaplandı. Tartılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, buz banyosu içerisinde bulunan numuneye azar azar eklenerek, manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaşça karıştırıldı ve çözünmesi sağlandı. $+4^\circ\text{C}$ 'de $12000 \times g$ 'de 15 dakika sanrifüj edildi. Süpernatant ve çökelek için aktivite ölçümü yapıldı. Süpernatant atıldı. Çökeleğe, pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponundan çok az miktarda eklendi ve baget yardımıyla karıştırılarak sıvı kıvama getirildi. Aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı.

➤ Diyaliz

%60-80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra elde ettiğimiz numune diyaliz torbasına konuldu. Diyaliz torbası, içerisinde pH'ı 7,0 olan 1 mM Na-fosfat tamponunun bulunduğu behere yerleştirildi. Numune $+4^\circ\text{C}$ 'de iki saat boyunca diyaliz edildi. Diyaliz sonunda aktivite ölçümü ve kantitatif protein tayini yapıldı.

➤ DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonunun hazırlanması

İyon değişim kromatografisi, farklı proteinleri, aralarında büyük ölçüde değişebilen bir özellik olan taşıdıkları yüke göre ayırır. Anyon değiştirme ve katyon değiştirme olmak üzere iki çeşidi vardır. Sabit faz, anyon değişim kromatografisinde pozitif yüklü olan ve katyon değişim kromatografisinde negatif yüklü olan matristen oluşur. Negatif olarak yüklü moleküller anyon değişim reçinelerine, pozitif olarak yüklü moleküller katyon değişim reçinelerine bağlanır. NaCl kullanılarak düşük tuz konsantrasyonundan yüksek tuz konsantrasyonuna doğru oluşturulan gradient, bağlı moleküllerin anyonlar (Cl^-) ve katyonlar (Na^+) ile yer değiştirmesini sağlar. İyon değiştiricinin ligand yoğunluğuna bağlı olarak, tuz konsantrasyonu ayarlanmalıdır.

Kromatografi matrislerinin tasarımında çeşitli malzemeler kullanılmıştır. Bunlar arasında en yaygın polisakaritler (selüloz, dekstran ve agaroz), sentetik organik polimerler (poliakrilamid, polimetakrilat, polistiren) ve inorganik malzemeler (silika, hidroksiapatit). Mekanik olarak stabil ve fonksiyonel bir matris üretmek için malzemeler kimyasal olarak çapraz bağlanır ve fonksiyonel bir ligand ile sağlanır. Üretimde mevcut olan ham maddelerin fiziksel ve kimyasal koşulları (çözücüler, baz malzemelerin konsantrasyonu ve çapraz bağlayıcılar, sıcaklık, vb.), sabit fazın özelliklerini belirler [158, 159].

Kuru haldeki DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim jelinden 5 g tartıldı. Üzerine 400-500 mL aralığında distile su eklendi ve su miktarı jelin suyu emme kapasitesine göre ayarlandı. 45-50 mL yatak hacmi elde etmek için beher içindeki jel su banyosuna konularak 85°C sıcaklıkta 5 saat boyunca bekletilip şişmesi sağlandı. Şişen jelin üzerine 0,5 N 100 mL soğuk HCl ilave edildi. 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi. Bu sırada jelin dibe çöktüğü gözlemlendi. İçerisinde HCl bulunan jelle 0,5 N 100 mL NaOH çözeltisi ilave edildi. Buzdolabında 30 dakika bekletilip nötrale edildi. Hazırlanan iyon değişim jelinin, nuçe hunisi, süzgeç kağıdı, nuçe erleni ve vakum pompası yardımıyla kurulan düzende havası alındı. 2,5 cm² x 20 cm boyutlarındaki kolona pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat dengeleme tamponundan konuldu. Havası alınan jel pastör pipet yardımıyla yavaş yavaş kolona tatbik edildi. Peristaltik pompa kullanılarak kolon akış hızı 10-15 mL/saat olarak ayarlandı. Jelin kolonun çeperlerine yapışmamasına, kurumamasına dikkat edildi. Kolon yine aynı tamponla dengelendi.

Kolonun kapalı sistemi açıldı. Jelin üst seviyesindeki tampon iyice emilip bittiğinde, diyaliz sonrası elde ettiğimiz enzim numunesi pipet yardımıyla kolona verildi.

Numune emildikten sonra kapalı sisteme dönülerek pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponuyla yıkama yapıldı. Tamponun 280 nm'de verdiği absorbans değeri ile toplanan elüatın 280 nm'de verdiği absorbans değeri eşitlenince yıkama işlemi sonlandırıldı.

Yıkama işlemi bitiminde kolona iki hazneli gradient mikseri bağlandı. Kolonla bağlantılı olan hazneye pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponundan 250 mL, diğer hazneye ise 1,5 M NaCl çözeltisinden 250 mL konuldu. Elüsyona başlandı ve elüatlar 3 mL olarak toplandı. Bu esnada kolonun akış hızı 10 mL/saat olarak ayarlandı. Her elüatın 280 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. 412 nm'deki absorbans değeri de ölçülerek aktivitesi belirlendi. Toplanan tüp sayısına karşı aktivite grafiği çizildi. Yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilerek kantitatif protein tayini yapıldı. Spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve verim hesaplandı.

➤ **Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonunun hazırlanması**

Boyut dışlama/dışarlama kromatografisi olarak da bilinen jel filtrasyon kromatografisi, farklı boyutlardaki molekülleri ayırmak için kullanılır. Değişen büyüklükteki, farklı proteinlerin ayrılmasının yanı sıra, belirli bir proteinin oligomerik formları da çözülebilir. Ayrıca bu teknik, bir numunenin tamponunu farklı bir numuneyle değiştirmek için kullanılabilir.

Jel filtrasyon kolonunun materyali ise çapraz bağlı poliakrilamid, agaroz, dekstran veya bunların herhangi birinin bir kombinasyonundan oluşur. Proteinler ve polimerler gibi büyük moleküller, boyutlarına bağlı olarak jel partiküllerinin porlarına giremez. Bu yüzden de jel partiküllerinin porlarına girebilen iyonlar ve tampon tuzları gibi küçük bileşiklerden, hareketli faz yardımıyla önce ayrışırlar. Yani ilk olarak büyük boyutlardaki moleküller, sonrasında da küçük boyutlardaki moleküller toplanır. Ayrıca bu yöntemin ayırma gücünün iyi olmasından dolayı protein molekül kütlesi tayini de yapılabilir.

Diğer kromatografik yöntemlerden farklı olarak, sabit faz ile hareketli fazın elemanları arasında bir bağ yoktur. Kolona enjekte edilen numune hacmine karşı dikkatli olunmalıdır. Çünkü numunenin hacmi büyükse, ayırma çözünürlüğü düşük olacaktır. Kolon hacminin %3'ünden daha azı kolona enjekte edilmelidir [1, 158].

Kuru haldeki Sephadex G-100 jelinden 5 g tartıldı. Üzerine 150-200 mL aralığında distile su eklendi ve su miktarı jelin suyu emme kapasitesine göre ayarlandı. Beher içindeki jel su banyosuna konularak 85°C sıcaklıkta 4 saat boyunca bekletilip şişmesi sağlandı. Nuçe hunisi, süzgeç kağıdı, nuçe erleni ve vakum pompası yardımıyla kurulan

düzenekte şişen jelin havası alındı. 3 cm² x 90 cm boyutlarındaki kolona pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat dengeleme tamponundan konuldu. Havası alınan jel pastör pipet yardımıyla yavaş yavaş kolona tatbik edildi. Jelin kolonun çeperlerine yapışmamasına, kurumamasına dikkat edildi. Peristaltik pompa kullanılarak kolon akış hızı 3 mL/saat olarak ayarlandı. Kolon yine aynı tamponla dengelendi. Tamponun 280 nm'de verdiği absorbens değeri ile toplanan elüatın 280 nm'de verdiği absorbens değeri eşitlenince dengeleme işlemi sonlandırıldı.

Dengelenmiş kolonun kapalı sistemi açıldı. Jelin üst seviyesindeki tampon iyice emilip bittiğinde, iyon değişim kolonundan elde ettiğimiz ve 0,125 µL gliserol ile karıştırdığımız enzim numunesi pipet yardımıyla kolona verildi. Numune emildikten sonra kapalı sisteme dönülerek pH'ı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponuyla yürütme işlemi yapıldı. Elüsyona başlandı ve elüatlar 3 mL olarak toplandı. Bu esnada kolonun akış hızı 3 mL/saat olarak ayarlandı. Her elüatın 280 nm'deki absorbens değeri ölçüldü. 412 nm'deki absorbens değeri de ölçülerek aktivitesi belirlendi. Bu işlem aktivite gözlenmeyene dek sürdü. Toplanan tüp sayısına karşı aktivite grafiği çizildi. Yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilerek kantitatif protein tayini ve PON1 enziminin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı. Ayrıca spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve verim hesaplandı.



Şekil 4.1. Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu (solda) ve DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonu (sağda)

4.7. Protein Tayini ile İlgili Çalışmalar

➤ Kalitatif protein tayini

Proteinlerin yapısında yer alan tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi aromatik halkalı aminoasitlerin 280 nm’de maksimum absorbans değeri göstermesi prensibine dayanır [160].

DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolon kromatografisinden ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisinden toplanan fraksiyonlar için bu yöntemle kalitatif protein tayini yapıldı. Spektrofotometrede 280 nm’de absorbanslar köre karşı okutuldu ve aktivite grafiği çizildi.

➤ **Kantitatif (Bradford yöntemiyle) protein tayini**

Deneye başlamadan önce serumda, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolon kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrasında enzim numunesinde Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boya olarak kullanılır. Kendisi negatif yüklü olan bu boya, proteindeki pozitif yüke çok hızlı bağlanır. Bu bağlanma sırasında Coomassie Brilliant Blue G-250'nin kırmızı formunun mavi forma ($\lambda_{\max}=595$ nm) dönüştüğü gözlenir. Yani oluşan kompleks 595 nm'de absorbands verir. Toplam reaksiyon 10 dakika sürmekle birlikte, yöntemin hassaslığı 1-100 µg aralığındadır [161].

1 mg/mL olacak şekilde stoğu hazırlanan standart sığır serum albümin çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak tüplere konuldu. Distile su ilavesiyle tüplerin son hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. Son olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden her tüpe 5 mL eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırılıp 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 595 nm'de, köre karşı 2 mL'lik kuvarz küvetlerde absorbands değerleri ölçüldü. Kör olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden kullanıldı. Elde edilen verilerle absorbandsa karşı µg protein standart grafiği oluşturuldu.

Serumda, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolon kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrasında enzim numunesinde bu yöntemle kantitatif protein tayini yapıldı. Önceden çizilen standart grafikten yararlanılarak protein miktar tayini yapıldı.

4.8. SDS-PAGE ile PON1 Enzim Saflığının Kontrolü

Laemmli metodu uygulanarak SDS-PAGE yapıldı ve insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin saflık derecesi kontrol edildi [162].

İlk olarak elektroforezin plakaları distile su ile, sonrasında %70'lik etanol ile yıkandı. Cam plakalar üst üste konulurken uç kısımlara plastik ince şeritler yerleştirilerek jel için alan oluşturuldu. Cam plakalar cihaza yerleştirildi ve vidalar sıkılarak sabitlendi. Ayırma jelinden iki cam plakanın arasına hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaş yavaş eklendi. Üst kısımda yaklaşık 1 cm boşluk bırakıldı. Bu boşluğa bir miktar %1'lik SDS ilave edilerek jel yüzeyinin düzgün oluşması sağlandı. İki saat sonunda jelin katılaştığı gözlemlendi. Üst kısımdaki %1'lik SDS dökülerek, kalan boşluğa yığma jelinden

eklendi. Cam plakalar arasına plastik tarak yerleştirilerek yığma jelinde kuyucuklar oluşması için iki saat jelin katılaşması bekledi. Plakalar dikkatli bir şekilde cihazdan çıkartıldı. Numune yüklenecek kuyucuklar belirlenerek kuyucukların net görülmesi için önce distile su, sonra yürütme tamponu ile yıkama yapıldı. Plakalar elektroforez tankına yerleştirilip, sabitlendi. Elektroforez tankına yürütme tamponu konuldu. Enzim numunesi 20 µg protein içerecek şekilde ayarlandı. 1:1 oranında numune tamponu ilave edilerek toplam 40 µL numune elde edildi. 3 dakika süresince kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Marker'den ise 20 µL alınıp, üzerine 1:1 oranında numune tamponu ilave edilerek 1 dakika süresince kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Marker ve numune soğuduktan sonra, belirlenen kuyucuklara mikropipet ile tatbik edildi.

Kapalı sistem oluşturularak elektroforez tankı akım cihazına bağlandı. Akım 40 volta ayarlanarak 20 dakika süresince yürütme işlemi yapıldı. Numuneler ayırma jeline ulaşınca akım 80 volta ayarlanarak iki buçuk saat süresince yürütme işlemi yapıldı. Bantlar jelin alt sınırına ulaşınca cihaz durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde alınarak sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletildi. Sonrasında jel boyama çözeltisi içerisine konularak bir gece boyunca çalkalayıcıda yavaş yavaş çalkalandı. Jel yıkama çözeltisi içerisine konularak rengi açılana dek çalkalayıcıda yavaş yavaş çalkalandı. Son olarak jel, distile su içine alındı. Yarım saatlik bekleme süresinin ardından görüntüleme cihazı ile jelin görüntüleri alındı.

4.9. İnsan Serumundan Saflaştırılan PON1 İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkisinin İncelenmesi

Crataegus tanacetifolia, *Rumex acetosella*, *Thymus sibthorpii* ve *Asphodeline taurica* bitkilerinin sulu ve etanollü ekstrelerinin PON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkileri belirlendi. 1 mg/mL olarak hazırlanan stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda alınarak paraoksonaz aktivitesi ölçüldü. Belirlenen aktivite etkilerine göre Aktivite (%) – [Ekstre] grafikleri çizildi.

Tablo 4.1. *PON1* enziminin aktivite ölçüm tablosu

Stok Aktivite Çözeltileri	Konrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (μ L)	Konsantrasyon (mM)	Hacim (μ L)	Konsantrasyon (mM)
Glisin/NaOH (pH 10,5)	500	25	500	25
Substrat Çözeltisi	330	1	330	1
Distile Su	120	-	Değişken	-
Bitki Ekstresi	-	-	Değişken	Değişken
Enzim Numunesi	50	-	50	-

4.10. Kullanılan Bitkilerin Antioksidan Kapasite Tayinlerinin Belirlenmesi

4.10.1. Demir indirgeme kuvveti tayini (Fe^{+3} - Fe^{+2})

Oyaizu (1986) yöntemi kullanılarak Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kuvveti tayini yapıldı [163].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve son hacim 1 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. Tüplerin üzerine 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyumferrisiyanür $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ eklenerek, 20 dakika süresince 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edildi. Sonrasında tüplere %10'luk TCA'dan 2,5 mL eklendi. Çözeltideki üst fazdan 2,5 mL alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve 0,5 mL %0,1'lik FeCl_3 ilave edildi. Spektrofotometrede 700 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak distile su, kontrol olarak ise numune yerine distile su kullanıldı.

4.10.2. FRAP metodu

Oyaizu (1986) yönteminin küçük bir değişimi ile, FRAP reaktifi kullanılarak Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kuvveti tayini yapıldı [163].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve son hacim 0,5 mL olacak şekilde asetat tamponu (0,3 M, pH 3,6) ilave edildi. Tüplerin üzerine 2,25 mL FRAP reaktifi ve 2,25 mL FeCl_3 eklenerek, 10 dakika süresince inkübe edildi. Spektrofotometrede 593 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak asetat tamponu, kontrol olarak ise numune yerine asetat tamponu kullanıldı.

4.10.3. CUPRAC metodu

Bakır iyonlarını indirgeme metodunun küçük bir değişimi ile, fenolik yapıdaki moleküllerin Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme aktiviteleri belirlendi [164].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve üzerlerine 125 μL CuCl_2 (0,01 M) çözeltisi, 125 μL etanolik neokuprin ($7,5 \cdot 10^{-3}$ M) çözeltisi ve 125 μL amonyum asetat tamponu (1 M) ilave edildi. 30 dakika sürecince karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometrede 450 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı.

4.10.4. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini

Re ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak ABTS^{++} giderme aktivitesi tayini yapıldı [165].

Hazırlanan 2 mM’lık ABTS çözeltisine, 2,45 mM’lık persülfat çözeltisi ilavesiyle ABTS^{++} oluşması sağlandı. ABTS^{++} çözeltisi kullanılmadan hemen önce 734 nm’de absorbans ölçümü yapıldı ve fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,4) yardımıyla absorbans $700 \pm 0,025$ nm olarak ayarlandı. Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve üzerlerine 0,5 mL ABTS^{++} çözeltisi ilave edildi. 30 dakika sürecince inkübe edildi. Spektrofotometrede 734 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

4.10.5. DPPH serbest radikal ($\text{DPPH}^{\cdot}$) giderme aktivitesi tayini

Blois metodu kullanılarak DPPH serbest radikal ($\text{DPPH}^{\cdot}$) giderme aktivitesi tayini yapıldı [166].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde etanol ilave edildi. Tüplerin üzerine önceden hazırladığımız ve serbest radikal olarak kullanılan 1 mM’lık DPPH çözeltisinden 0,5 mL eklenerek, 30 dakika sürecince karanlık ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. Spektrofotometrede 517 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak etanol, kontrol olarak ise 0,5 mL DPPH ve 2 mL etanolden oluşan çözelti kullanıldı. 517 nm’de ölçülen absorbans değerlerinin azalması kalan $\text{DPPH}^{\cdot}$ miktarını verdi ve serbest radikal aktivesi belirlendi.

4.10.6. DMPD radikali (DMPD^{•+}) giderme aktivitesi tayini

Fogliano ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak DMPD radikali giderme aktivitesi tayini yapıldı.

Hazırlanan asetat tamponundan (100 mM, pH 5,3) 100 mL alınarak üzerine 1 mL DMPD çözeltisi ve 0,2 mL FeCl₃ (0,05 M) ilavesiyle DMPD^{•+} oluşması sağlandı. DMPD^{•+} çözeltisi kullanılmadan hemen önce 505 nm’de absorbans ölçümü yapıldı ve fosfat tamponu (0,1 M, pH 5,3) yardımıyla absorbans 900 ± 0,100 nm olarak ayarlandı. Aynı gün içinde deneyde kullanıldı [167].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve son hacim 0,5 mL olacak şekilde distile su ilave edildi. Tüplerin üzerine 1 mL DMPD^{•+} çözeltisi eklenerek, 50 dakika sürecince inkübe edildi. Spektrofotometrede 505 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

4.10.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini

Re ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemle göre, bipiridil reaktifi kullanılarak metal şelatlama aktivitesi tayini yapıldı [165].

Deney tüplerinin hepsine 125 µL 2 mM’lık FeSO₄ çözeltisinden konuldu. Üzerlerine her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında alınarak eklendi. Son olarak 500 µL Tris-HCl tamponu (0,1 M, pH 7,4) ilave edilerek 30 dakika sürecince oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre bitiminde tüplere 125 µL bipiridil reaktifi ve 595 µL distile su eklenerek, son hacim 3 mL olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Spektrofotometrede 522 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak etanol, kontrol olarak ise antioksidan madde yerine etanol kullanıldı.

4.10.8. Süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) giderme aktivitesi tayini

Zhishen ve arkadaşlarının uyguladığı yönteminin küçük bir değişimi ile, nitroblue tetrazolium (NBT) kullanılarak süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) giderme aktivitesi belirlendi [168].

Her bitki ve standart için, fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8) ile ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu. Üzerlerine sırasıyla 1,33.10⁻⁵ M’lık riboflavin, 4,46.10⁻⁵ M’lık

metiyonin ve $8,15 \cdot 10^{-8}$ M'lık NBT ilave edildi. Karışım, oda sıcaklığında ve 20 W'lık floresan ışığın bulunduğu ortamda 2 saat süresince inkübe edildi. Spektrofotometrede 760 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı.

4.10.9. Total fenolik bileşik miktar tayini

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) yöntemi uygulanarak total fenolik bileşik miktar tayini yapıldı [169].

Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden $50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ alınarak deney tüplerine konuldu ve üzerine 3,9 mL distile su ve $750 \mu\text{L}$ FCR eklendi. Yaklaşık 5 dakikalık bekleme süresinden sonra %20'lik NaCO_3 çözeltisinden $750 \mu\text{L}$ eklenerek, 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. Spektrofotometrede 760 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı. Total fenolik bileşik miktarları, ölçülen absorbans değerleri ve gallik asit için çizilen standart grafikten yararlanılarak belirlendi.

4.10.10. Total antioksidan aktivite tayini

Tiyosiyanat metodu kullanılarak, çalıştığımız bitkilerin ve standart maddelerin total antioksidan aktivitesi belirlendi. Her bitki ve standart için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerden sırasıyla 10, 20 ve $30 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarında alınarak deney tüplerine konuldu ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde fosfat tamponu (0,01 M, pH 7,4) ilave edildi. Üzerlerine 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu eklenerek, karanlıkta ve 37°C 'de inkübe edildi. Her 12 saat sonunda tüplerden $100 \mu\text{L}$ numune alınarak üzerine sırasıyla 4,7 mL etanol, $100 \mu\text{L}$ SCN^- çözeltisi ve $100 \mu\text{L}$ 20 mM'lık Fe^{2+} çözeltisi ilave edildi. Spektrofotometrede 500 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak 4,7 mL etanol içerisine, $100 \mu\text{L}$ SCN^- çözeltisi ve $100 \mu\text{L}$ 20 mM'lık Fe^{2+} çözeltisi ilavesiyle hazırlanan çözelti kullanıldı. Kontrol olarak ise numune çözelti yerine tampon eklenerek hazırlanan çözelti kullanıldı. Kontrol maksimum absorbansa ulaştığında inkübasyon ve absorbans ölçüm işlemi sonlandırıldı.

4.11. MTT Sitotoksosite Testi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), canlı hücrelerin metabolik aktivitesini tahmin etmede popüler bir araçtır. Bu kolorimetrik yöntem kullanılarak bir hücre topluluğunda bulunan canlı hücreler kantitatif olarak saptanabilir. Bu yöntemin prensibi hücrenin sağlam mitokondriyasının kolorimetrik substrat olan MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanır. Tetrazolium halkasındaki parçalanma dehidrogenaz enzimlerince (SDH) gerçekleşir ve bu parçalanma sonucunda başta sarımtırak renkte olan MTT, yoğun mavi-mor renkte ve çözünmez olan formazana dönüşür. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla gerçekleşir. Tetrazolium tuzu sadece metabolik aktiviteye sahip olan hücreler aracılığıyla renkli formazanlara indirgendiği için MTT yöntemi canlı hücreleri saptayabilir. Uygun şekilde optimize edilmiş koşullar altında, elde edilen absorbans değeri, canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır. Bir renk değişimine uğramayan hücreler ise mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş ya da ölmüş hücrelerdir. MTT yönteminde sırasıyla: Hücreler MTT boyası ile uygun koşullar sağlanarak inkübasyona bırakılır, çözünmez olan formazan çözücü yardımıyla çözünür duruma getirilir ve oluşan rengin kolorimetrik ölçümü yapılır [170, 171].

Fare (*Mus musculus*) adipoz sağlıklı fibroblast hücre hattı (L929), %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri ortamında inkübatörde 37°C’de %5’lik CO₂ ortamında inkübe edildi. Üç günde bir tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak yüzeye tutunmuş hücrelerin kalkması sağlandı ve 1:3 oranda alt kültürlerle ayrılarak pasajlandı. MTT ile deneysel çalışmalarda kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarının sitotoksisiteleri tespit edildi. Bitki ekstraktlarının stok çözeltileri 40 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. MTT yöntemi için 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 10000 hücre ekilip, hücrelerin plakanın kuyucuklarının tabanına yapışması için 24 saat süresince inkübatörde 37°C’de %5’lik CO₂ ortamında proliferasyona bırakıldı. Geçen sürenin sonunda plakada hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Üzerine bitki ekstraktlarını ilave ederek hazırladığımız taze besiyerden, en yüksek konsantrasyon 500 µg/mL alınıp her seferinde 1:1 oranında konsantrasyonları seyreltilerek 8 farklı konsantrasyon uygulandı. İkili kontrol grubundan ve sekizli çalışma grubundan oluşan 10 deney grubu oluşturuldu. Tekrar 24 saat süresince inkübe edilerek bu sürenin sonunda ELISA Reader ile 540 nm’de absorbans değeri ölçülerek ve sitotoksosite düzeyleri hesaplandı. Deneysel çalışmalar 3 tekrarlı olarak yapıldı.

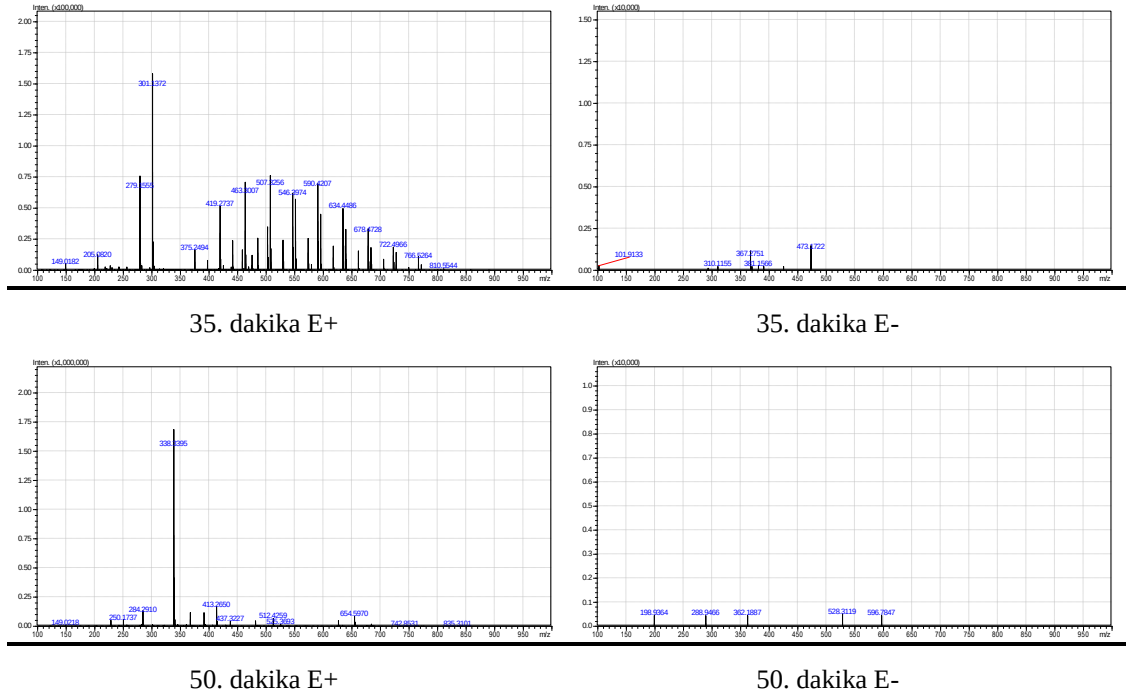
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

5.1. LC/MS-IT-TOF

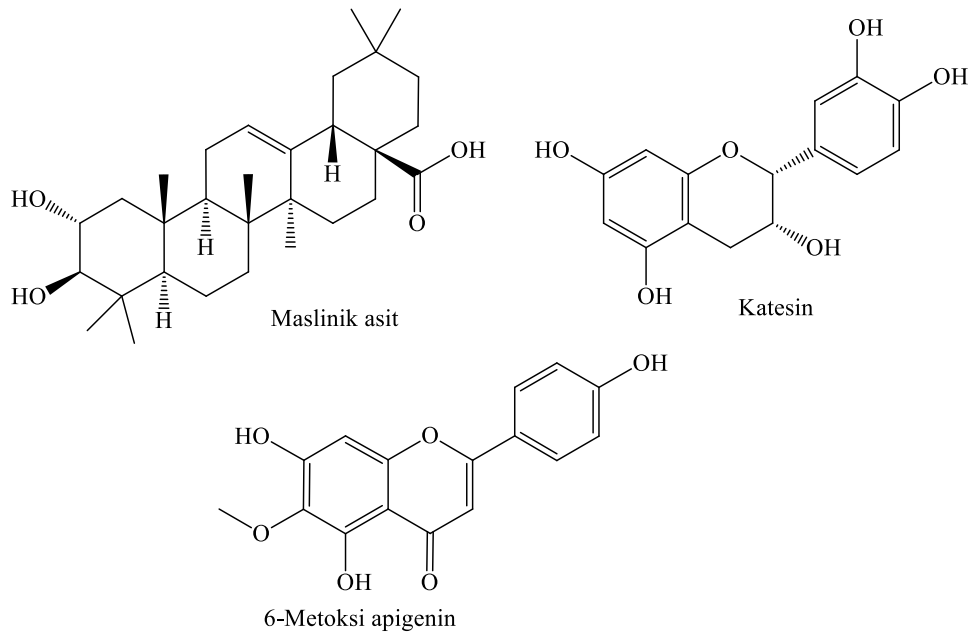
LC/MS-IT-TOF cihazı yardımıyla hem pozitif iyon modunda hem de negatif iyon modunda kütle spektrumlarına göre maddeler tespit edilebilir. Bu amaçla LCMS-IT-TOF, iyon tuzağının parçalanma gücünü, uçuş süresi kütle spektrometresinin yüksek çözünürlüğünü ve kütle hassasiyetini kullanarak maddeler hakkında hem kimyasal hem de yapısal bilgi edinmelerini sağlar. Çalışmada kullanılan 4 farklı bitkinin sulu ve etanollü ekstraktlarının içeriği; pozitif ve negatif elektrospey iyonizasyon usulü modları ile yüksek çözünürlüklü iyon tuzağı/uçuş süresi kütle spektrometresiyle (LC/MS-IT-TOF) birleştirilmiş sıvı kromatografisi aracılığıyla tespit edildi [155].

LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Crataegus tanacetifolia* sulu ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler Şekil 5.2’de, *Crataegus tanacetifolia* etanollü ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler Şekil 5.4’te, *Rumex acetosella* sulu ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler Şekil 5.6’da, *Rumex acetosella* etanollü ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler Şekil 5.8’de, *Thymus sibthorpii* sulu ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler 5.10’da, *Thymus sibthorpii* etanollü ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler 5.12’de, *Asphodeline taurica* sulu ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler 5.14’te, *Asphodeline taurica* etanollü ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler 5.16’da verilmiştir.

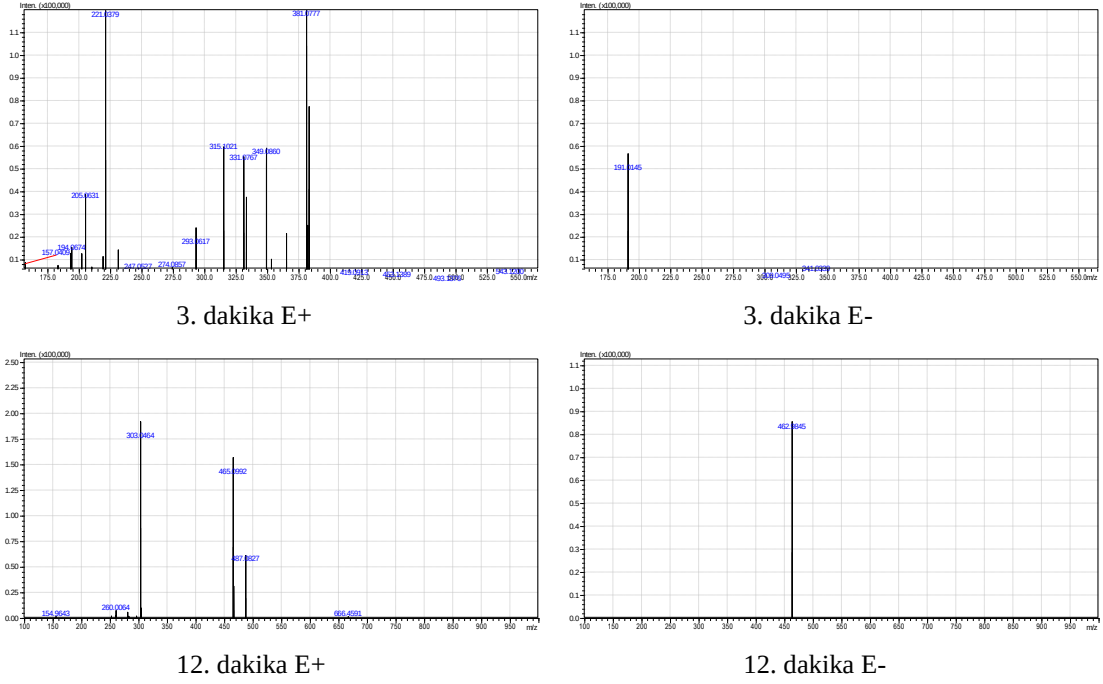
5.1.1. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin içerik analizi



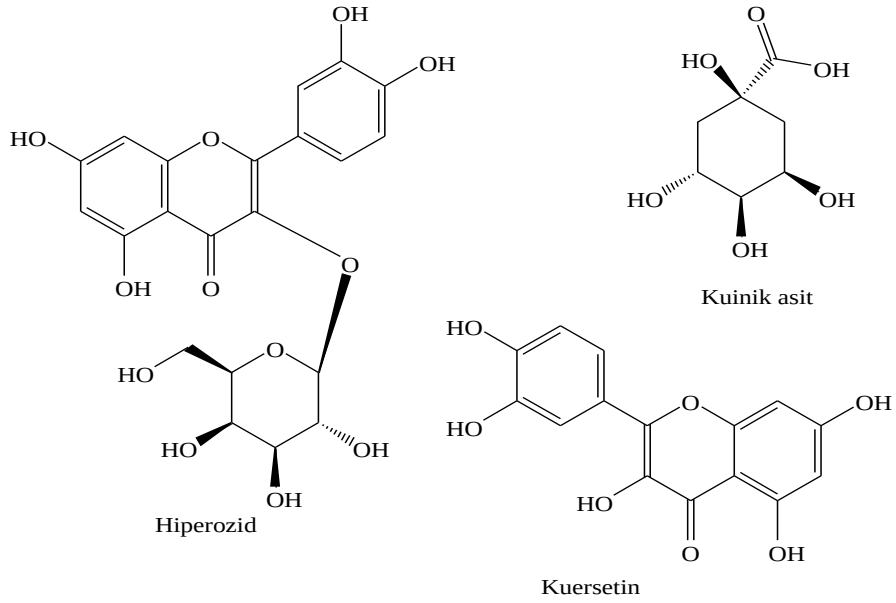
Şekil 5.1. *Crataegus tanacetifolia* sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları



Şekil 5.2. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Crataegus tanacetifolia* sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

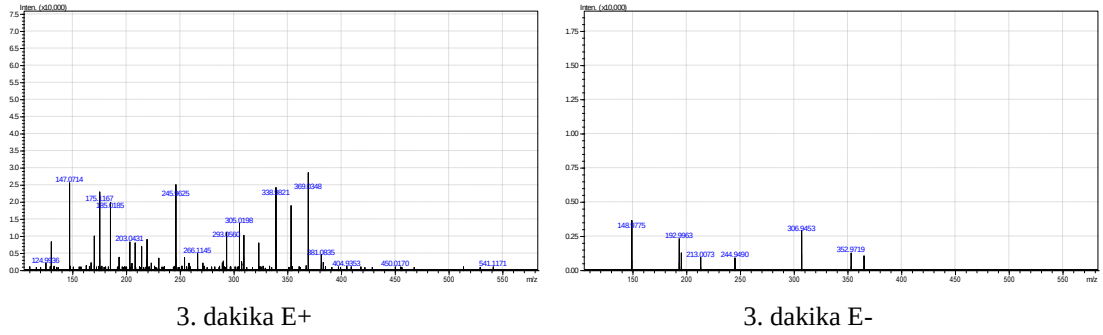


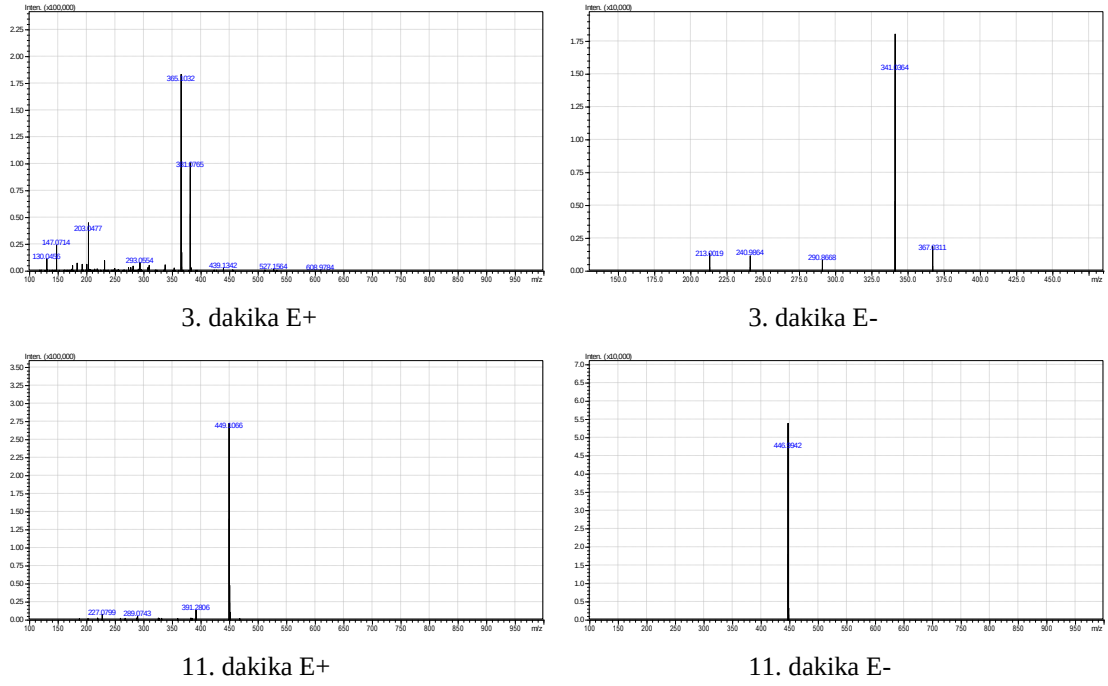
Şekil 5.3. *Crataegus tanacetifolia* etanolü ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları



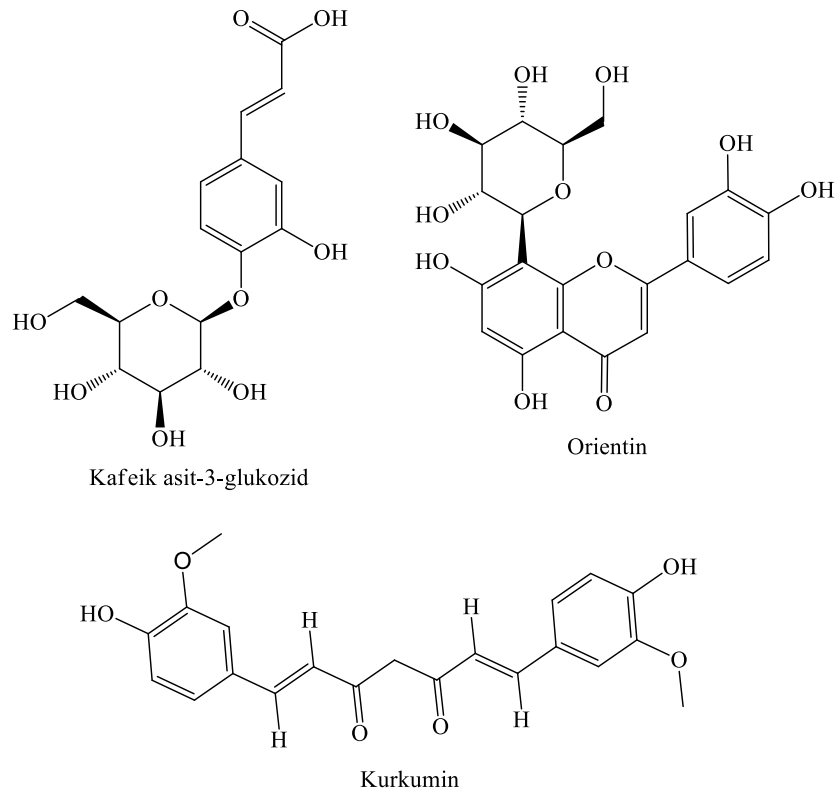
Şekil 5.4. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Crataegus tanacetifolia* etanolü ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

5.1.2. *Rumex acetosella* bitkisinin içerik analizi



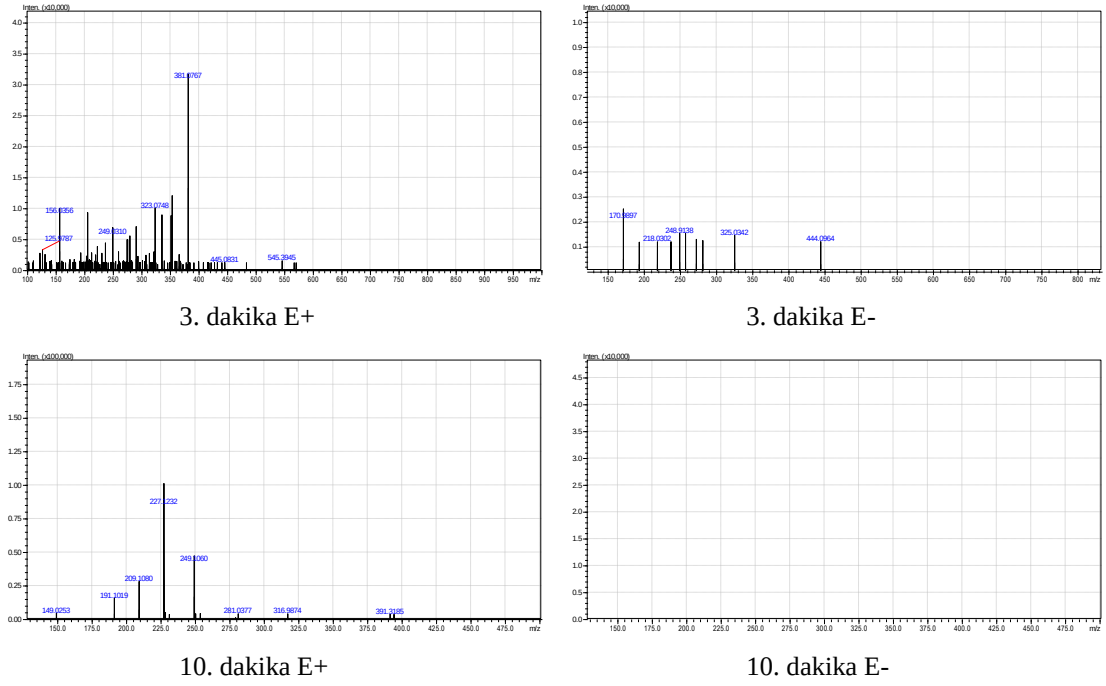


Şekil 5.7. *Rumex acetosella* etanollü ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

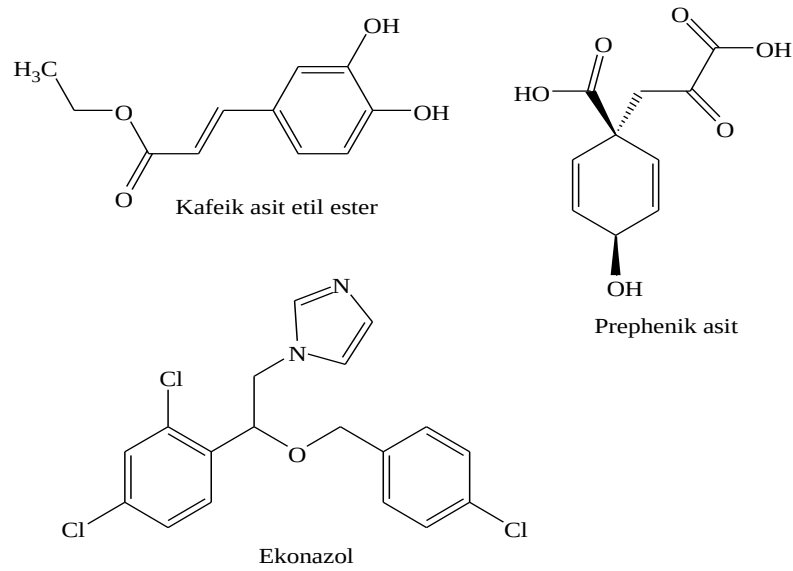


Şekil 5.8. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Rumex acetosella* etanollü ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

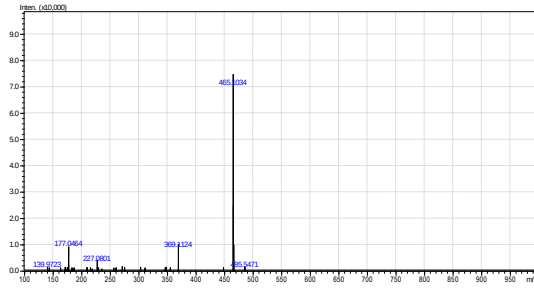
5.1.3. *Thymus sibthorpii* bitkisinin içerik analizi



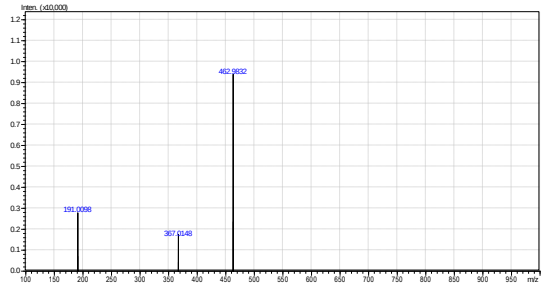
Şekil 5.9. *Thymus sibthorpii* sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları



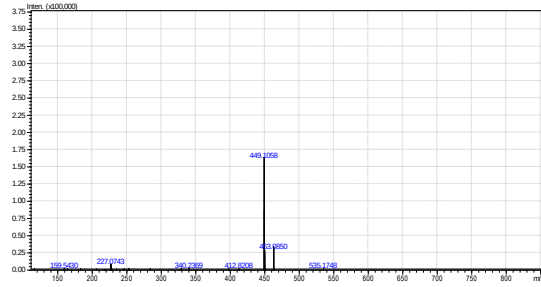
Şekil 5.10. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Thymus sibthorpii* sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler



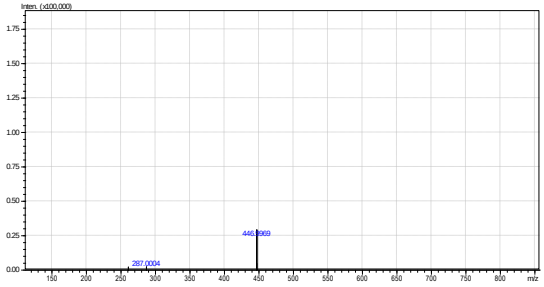
10. dakika E+



10. dakika E-

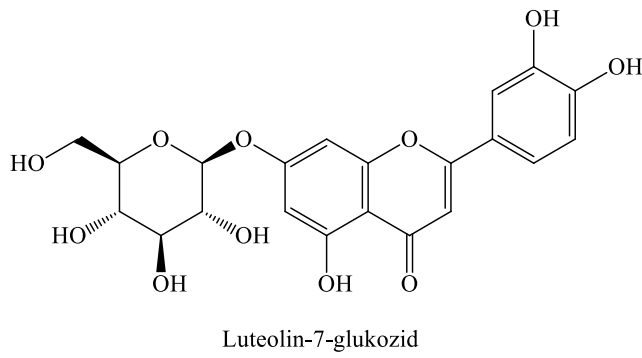
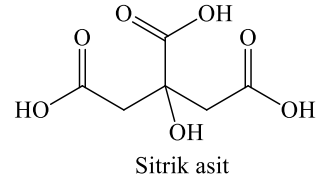
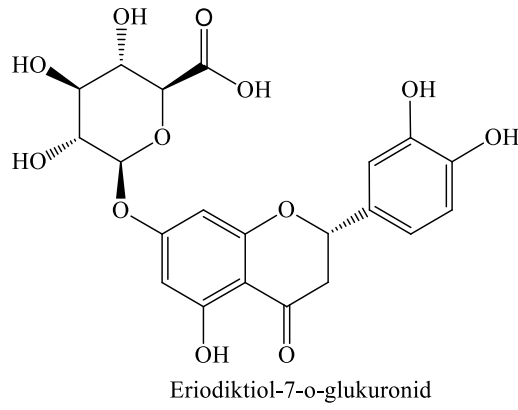


11. dakika E+



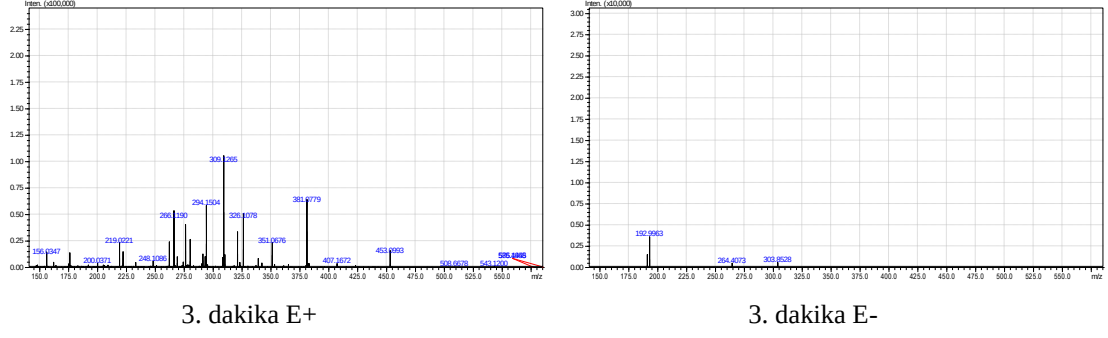
11. dakika E-

Şekil 5.11. *Thymus sibthorpii* etanolü ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları

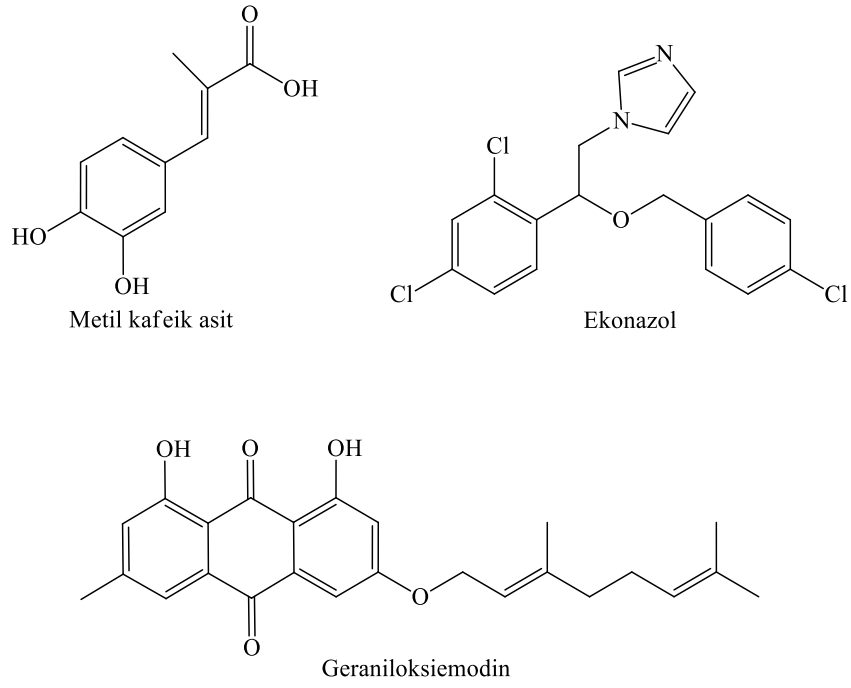


Şekil 5.12. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Thymus sibthorpii* etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

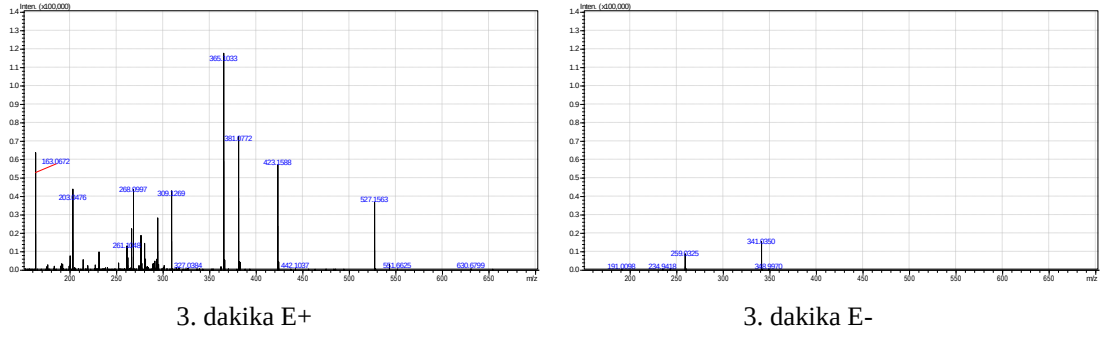
5.1.4. *Asphodeline taurica* bitkisinin içerik analizi



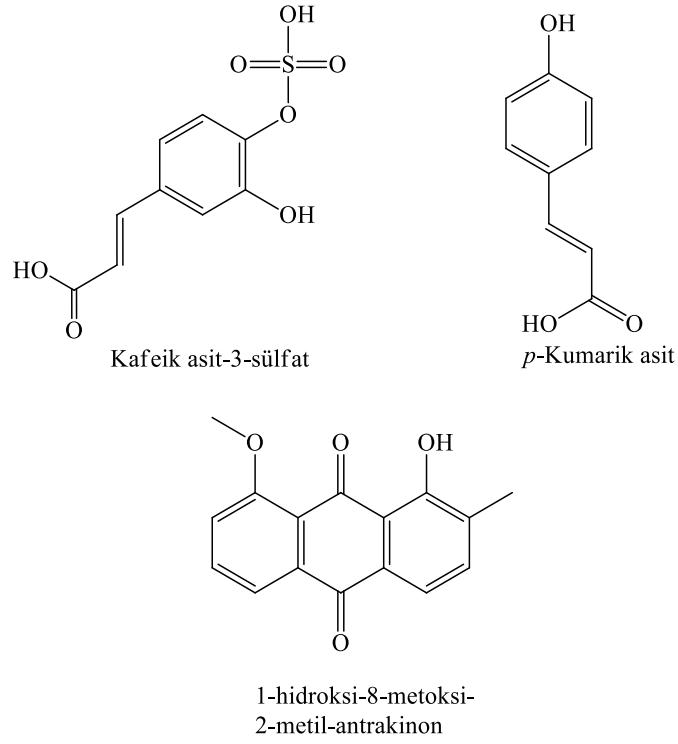
Şekil 5.13. *Asphodeline taurica* sulu ekstrelerinin E+ ve E- tarama sonuçları



Şekil 5.14. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Asphodeline taurica* sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler



Şekil 5.15. *Asphodeline taurica* etanollü ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

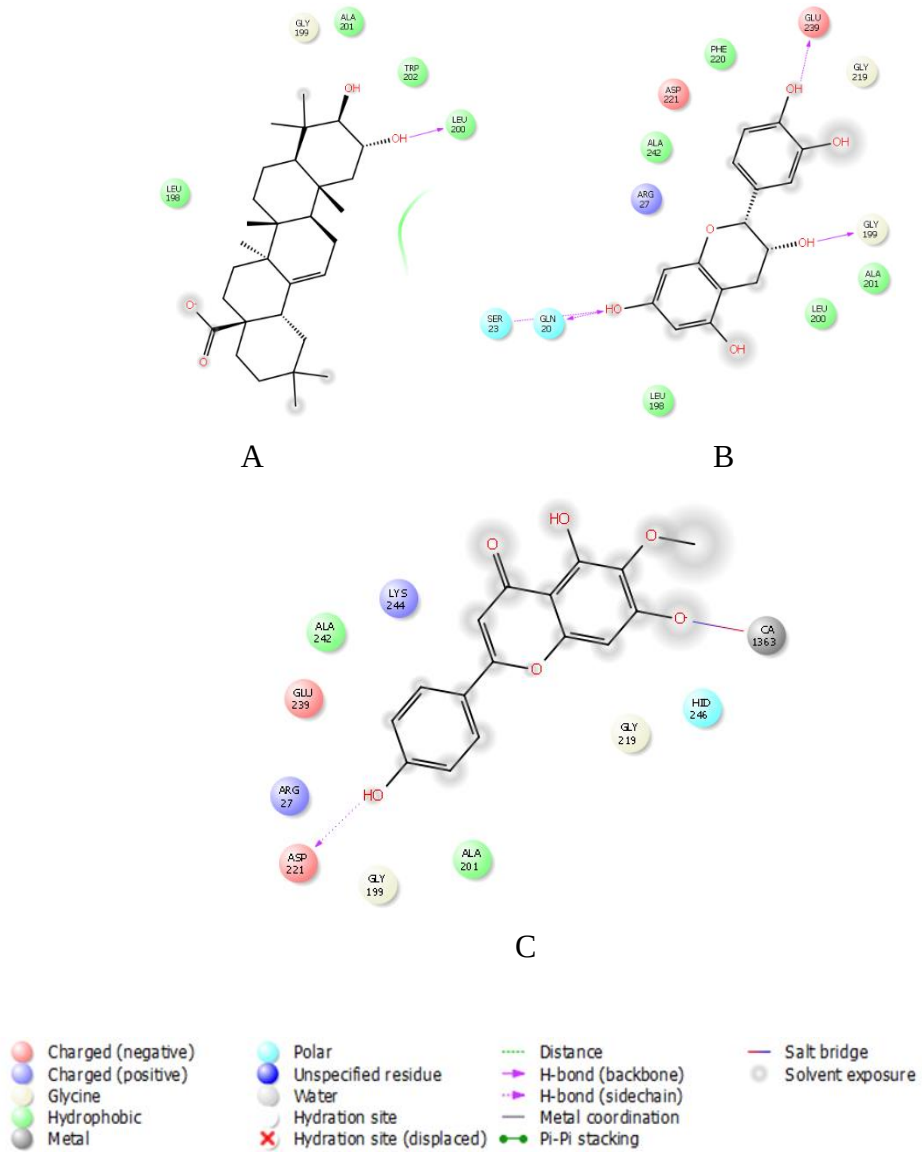


Şekil 5.16. LC/MS-IT-TOF analizi sonucu *Asphodeline taurica* etanollü ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

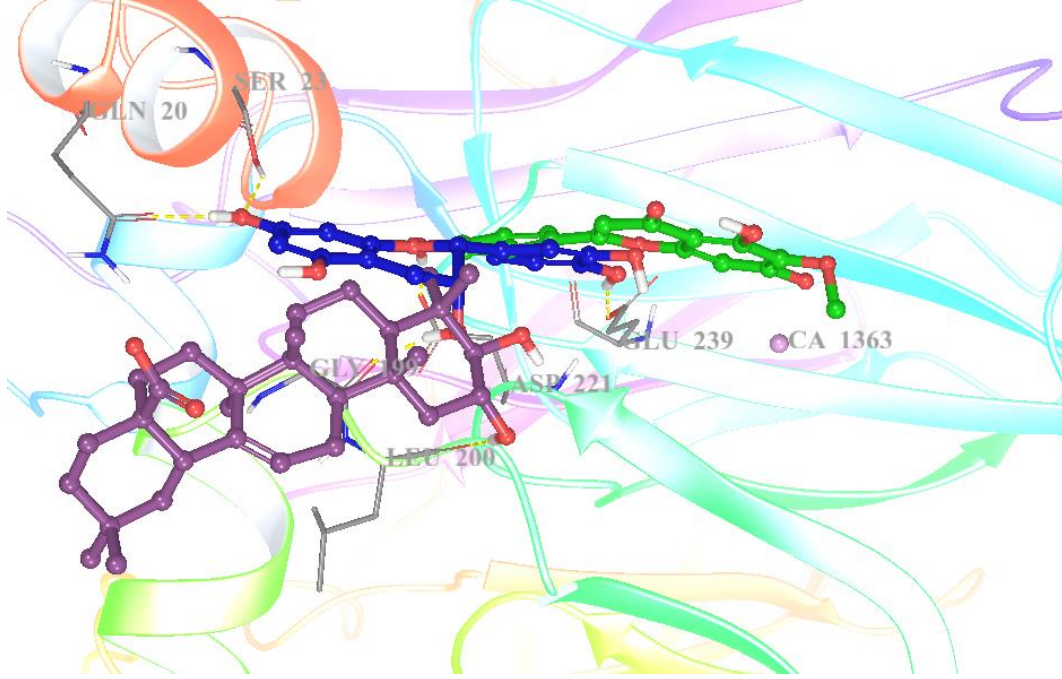
5.2. Moleküler Modelleme (Docking) Bulguları

LC/MS-IT-TOF analizi sonucu bitki ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler Schrödinger's Maestro moleküler docking programının “ligand hazırlama” modülünde PON1 enziminin uygun X-ray kristal yapısı (3SRG) seçilerek optimize edilmiştir.

5.2.1. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



Şekil 5.17. A: Maslinik asit, B: Kateşin ve C: 6-Metoksi apigenin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi



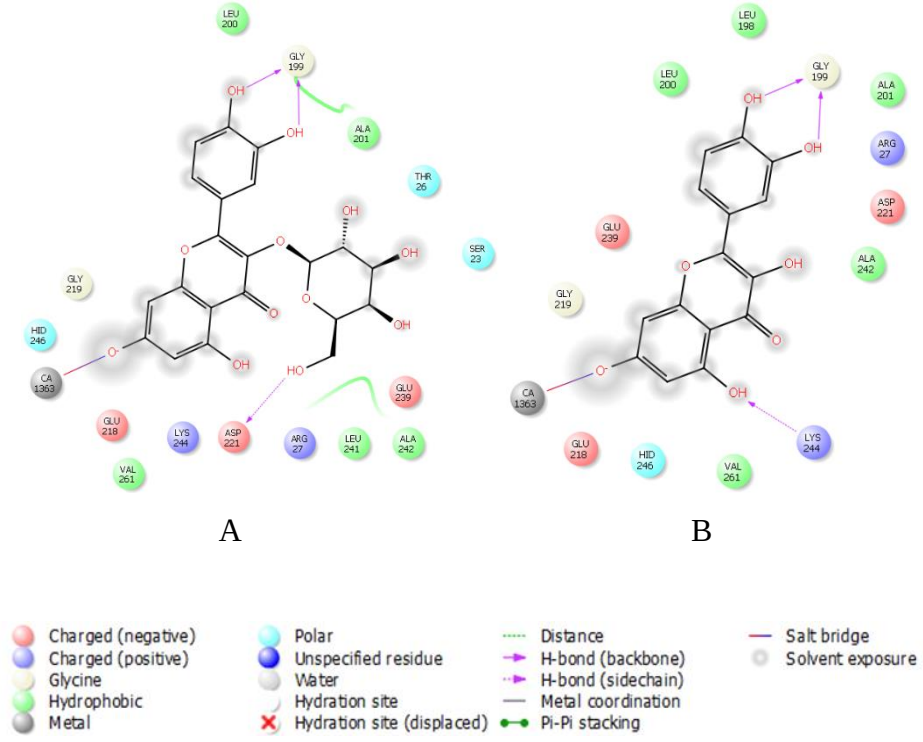
● Maslinik asit

● Kateşin

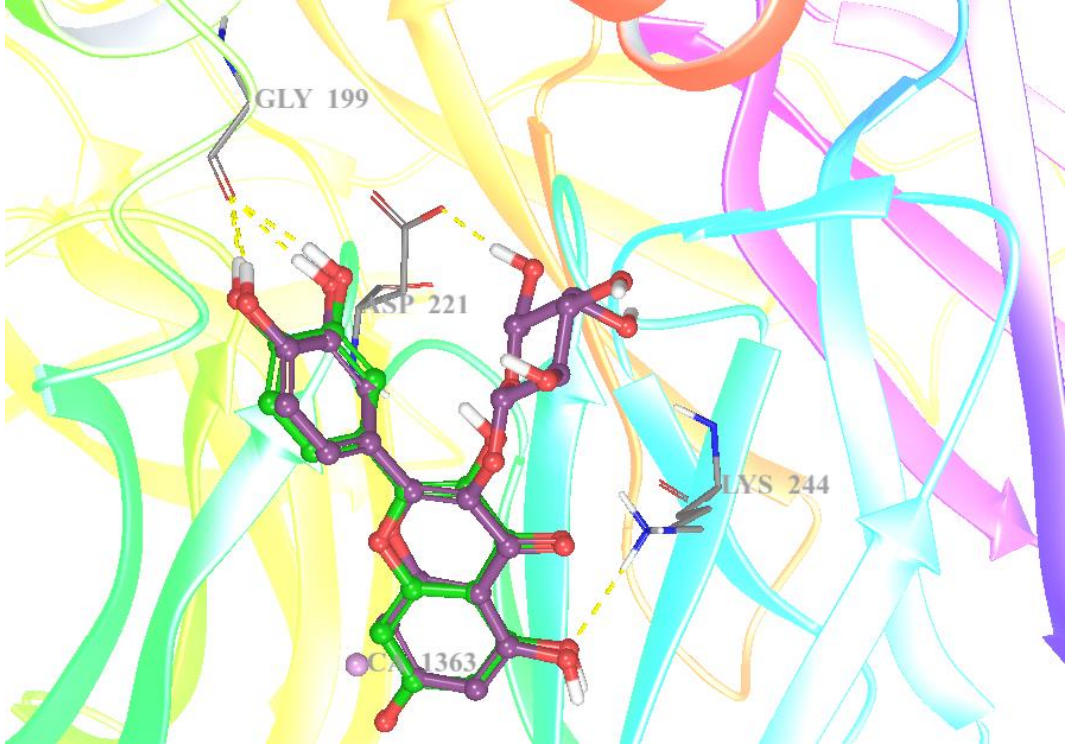
● 6-Metoksi apigenin

Şekil 5.18. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Maslinik asit, B: Kateşin ve C: 6-Metoksi apigenin bileşiklerinin etkileşimi

5.2.2. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



Şekil 5.19. A: Hiperozid ve B: Kuersetin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi

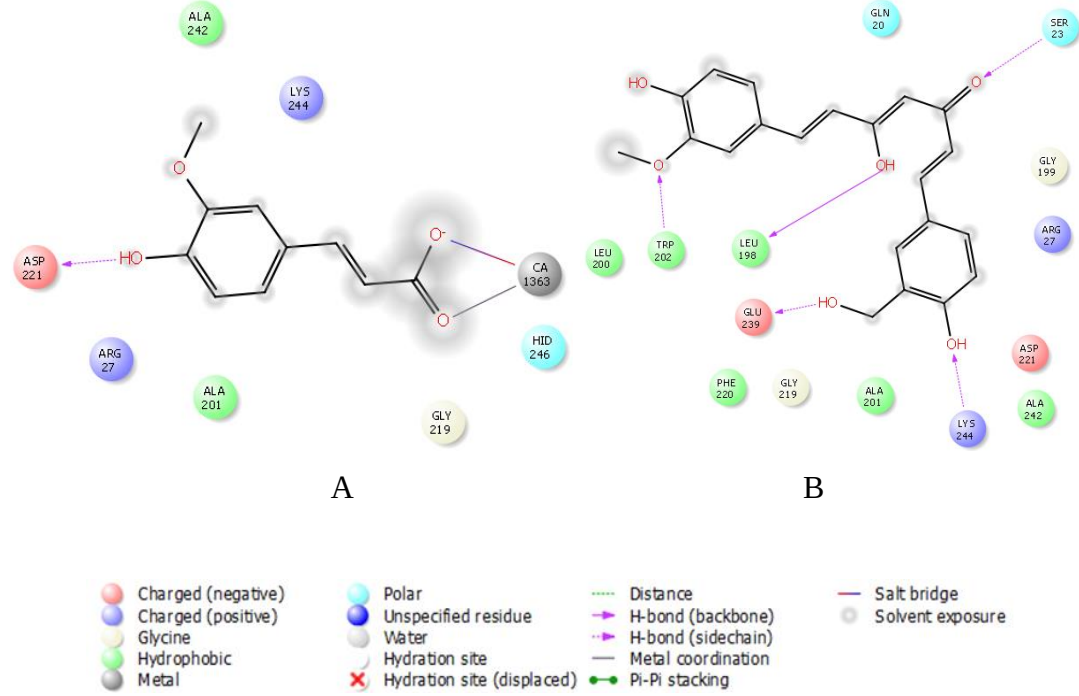


● Hiperozid

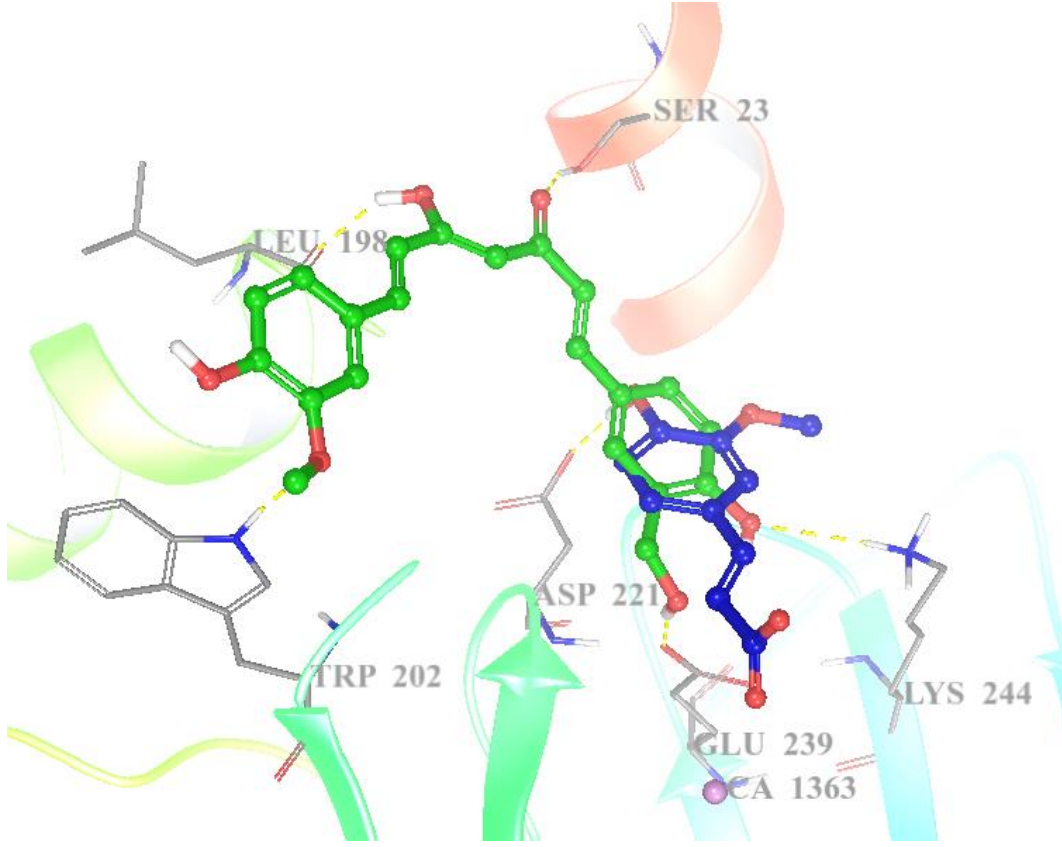
● Kuersetin

Şekil 5.20. *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin etanol ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Hiperozid ve B: Kuersetin bileşiklerinin etkileşimi

5.2.3. *Rumex acetosella* bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



Şekil 5.21. A: Ferulik asit ve B: Kurkumin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi

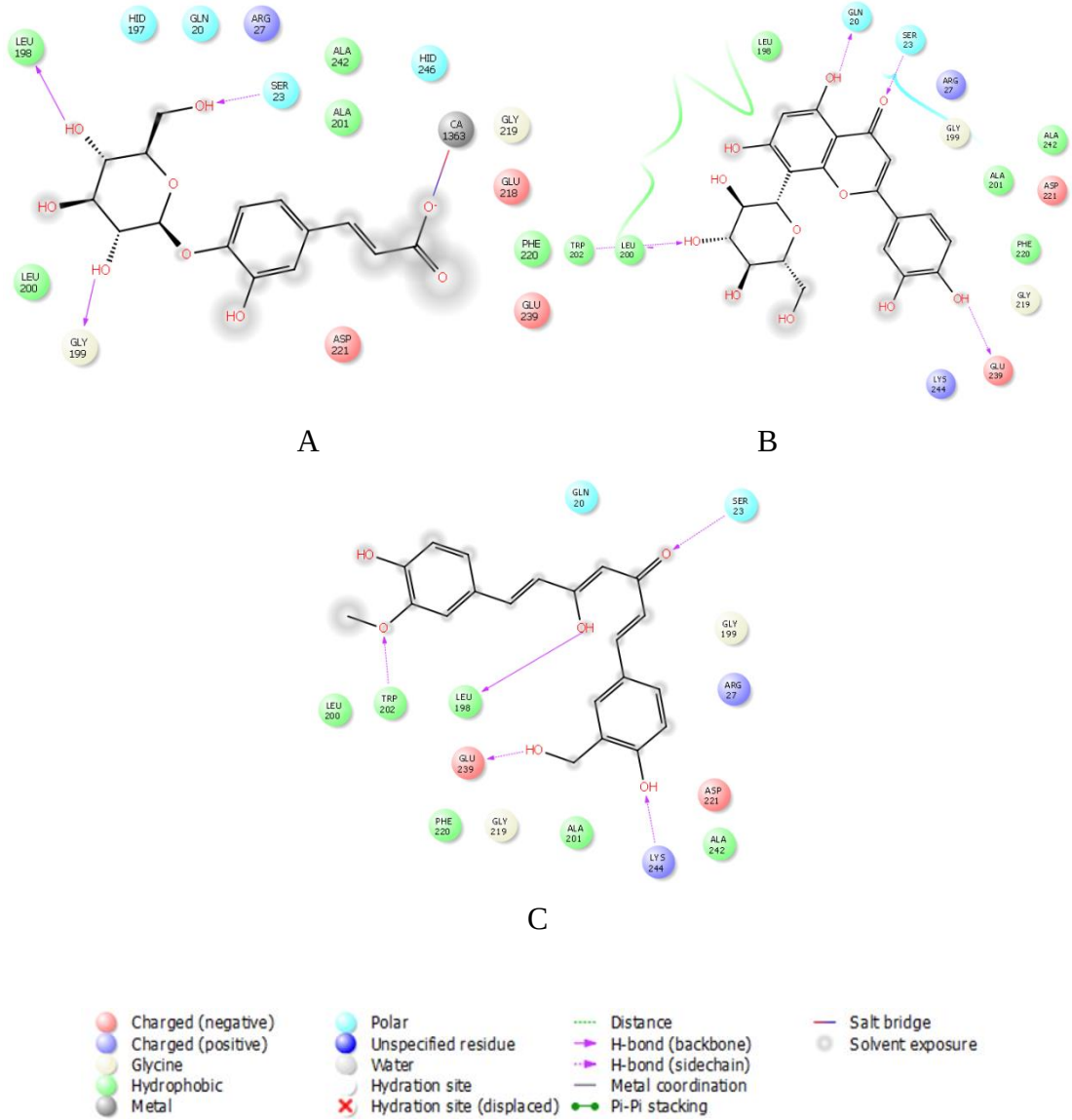


● Ferulik asit

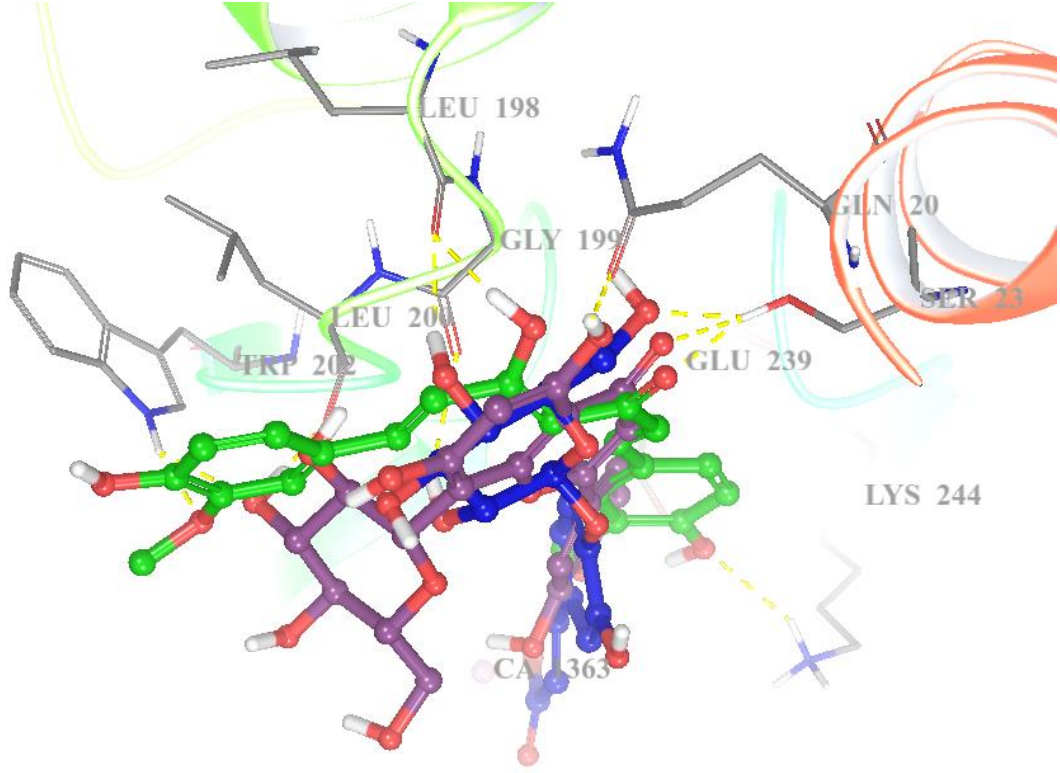
● Kurkumin

Şekil 5.22. *Rumex acetosella* bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Ferulik asit ve B: Kurkumin bileşiklerinin etkileşimi

5.2.4. *Rumex acetosella* bitkisinin etanol ekstratlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



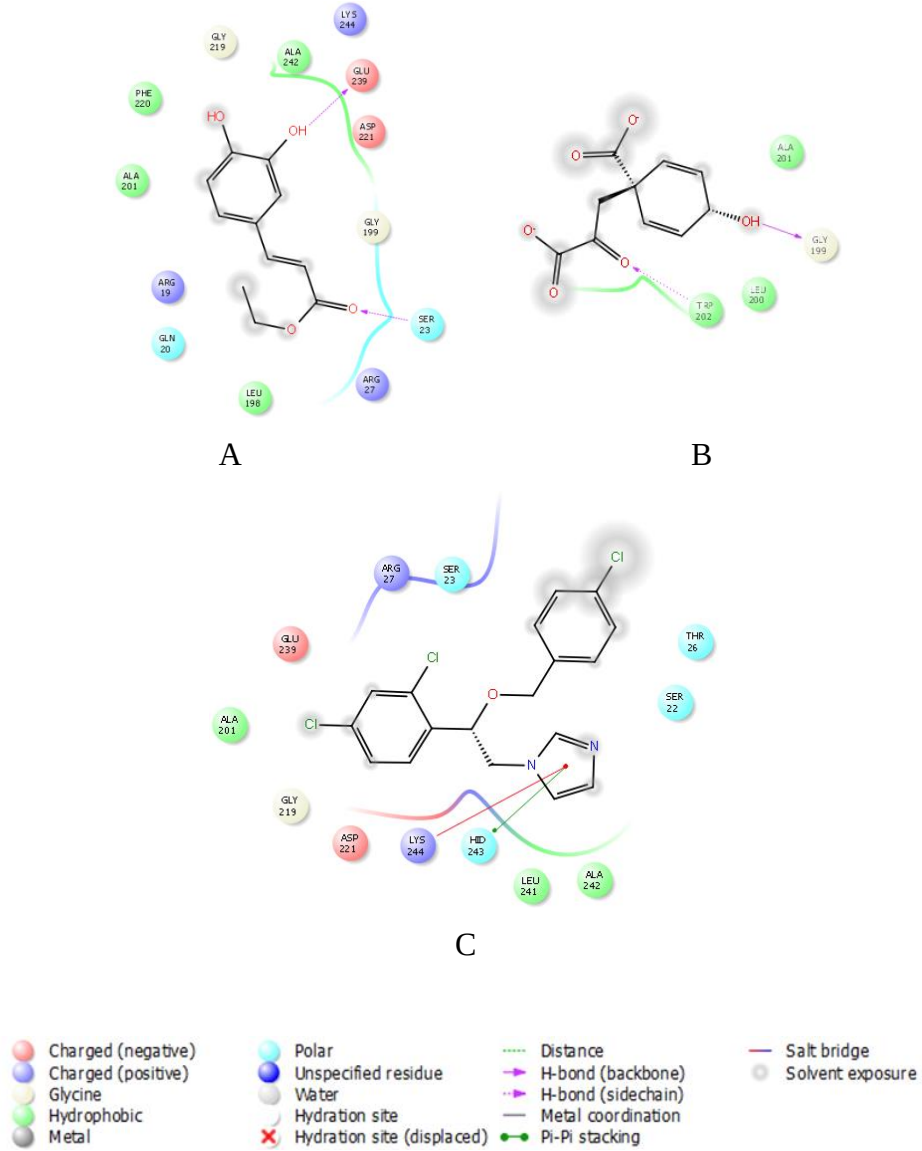
Şekil 5.23. A: Kafeik asit-3-glukozid, B: Orientin ve C: Kurkumin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi



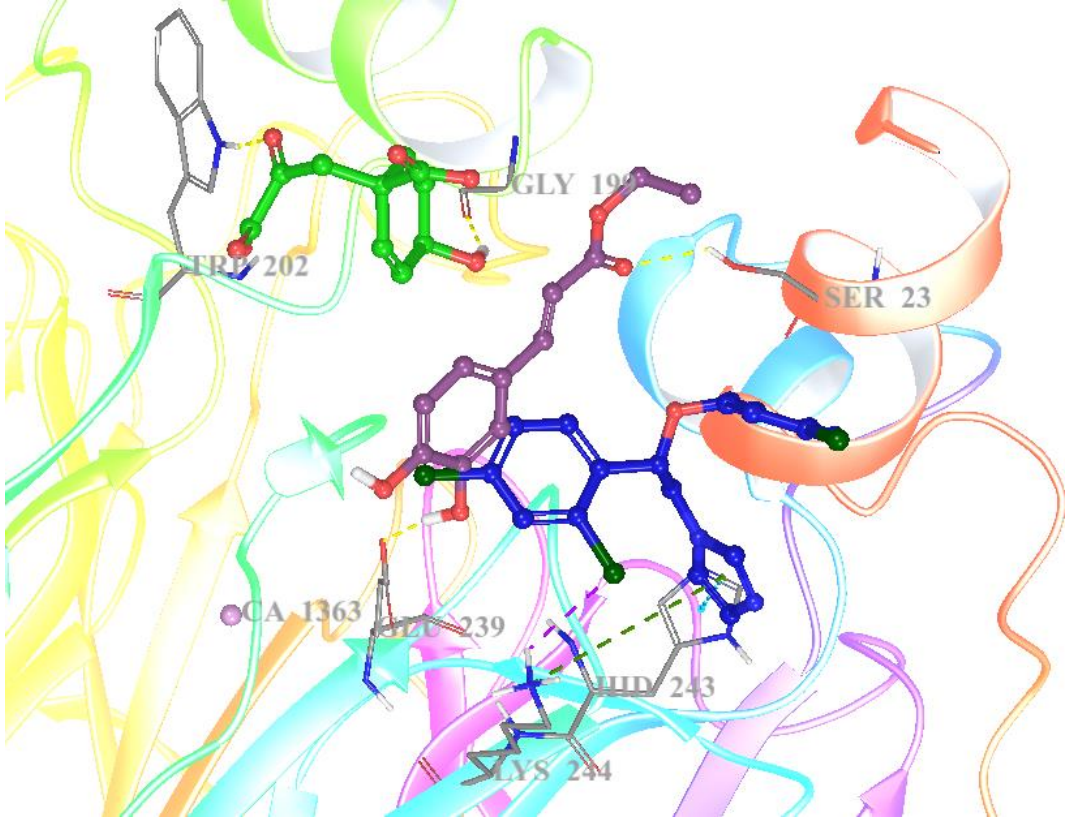
● Orientin ● Kafeik asit-3-glukozid ● Kurkumin

Şekil 5.24. *Rumex acetosella* bitkisinin etanol ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit-3-glukozid, B: Orientin ve C: Kurkumin bileşiklerinin etkileşimi

5.2.5. *Thymus sibthorpii* bitkisinin sulu ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



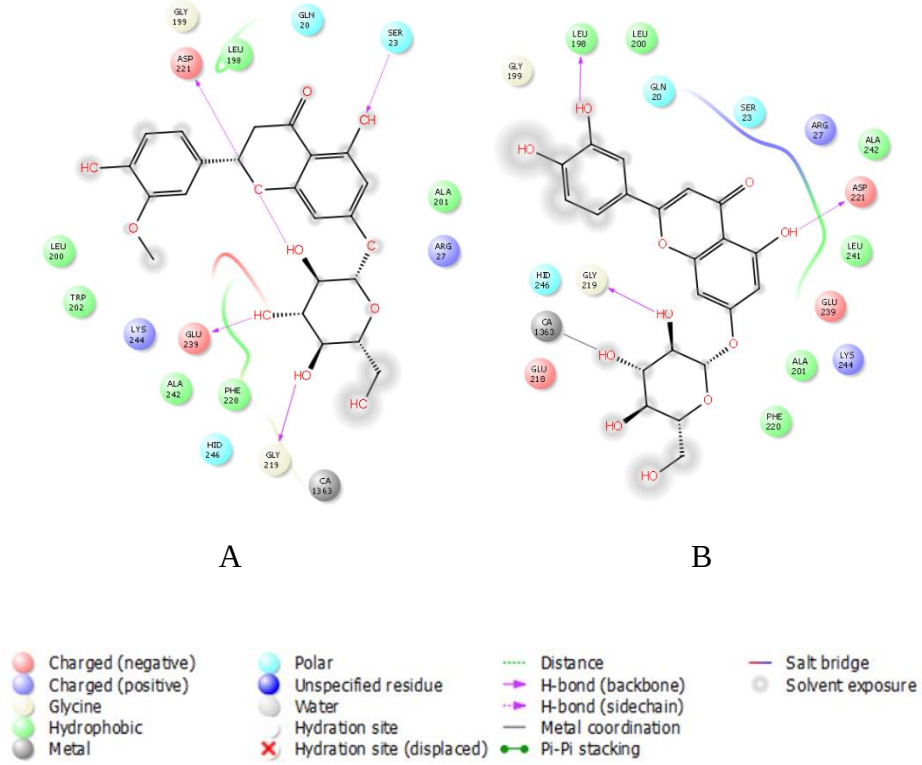
Şekil 5.25. A: Kafeik asit etil ester, B: Prephenik asit ve C: Ekonazol bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi



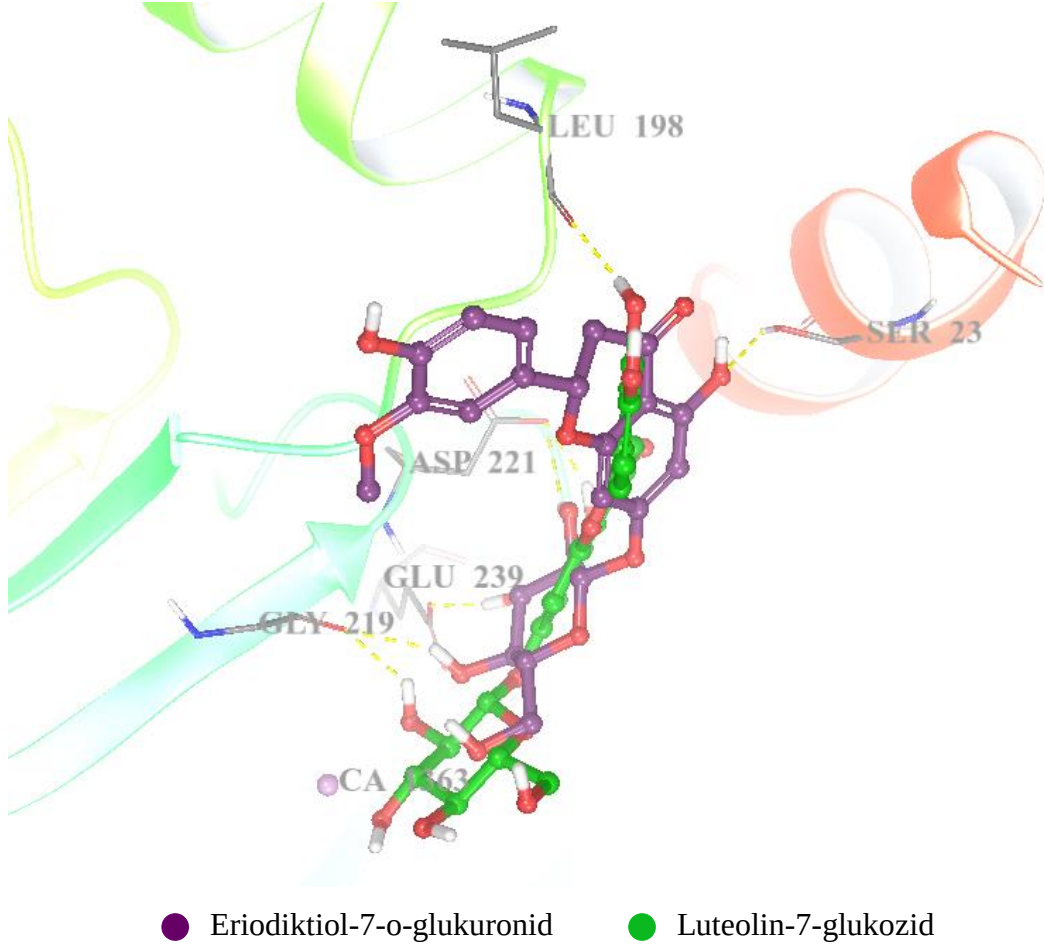
● Kafeik asit etil ester ● Ekonazol ● Prephenik asit

Şekil 5.26. *Thymus sibthorpii* bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit etil ester, B: Prephenik asit ve C: Ekonazol bileşiklerinin etkileşimi

5.2.6. *Thymus sibthorpii* bitkisinin etanollü ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları

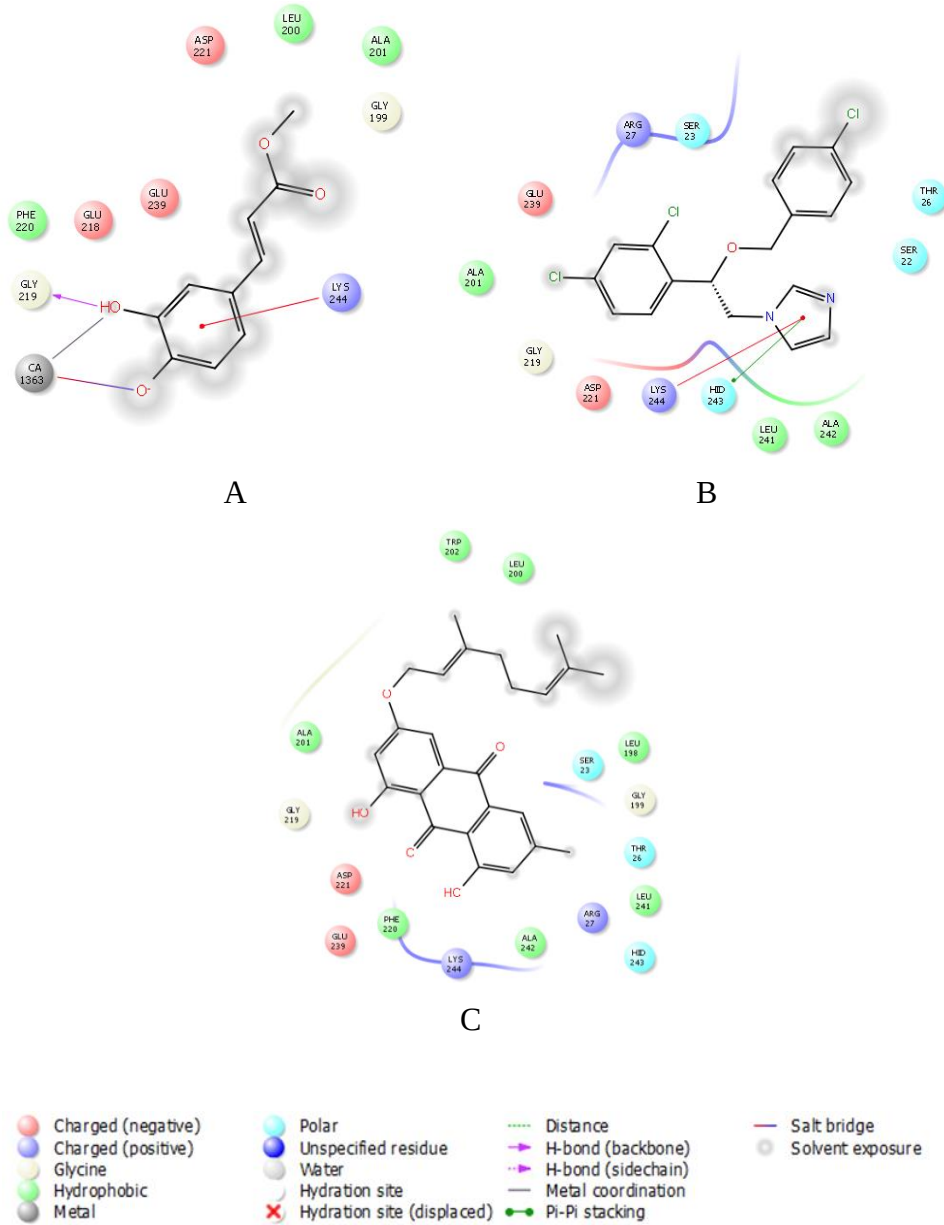


Şekil 5.27. A: Eriodiktol-7-o-glukuronid ve B: Luteolin-7-glukozid bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi

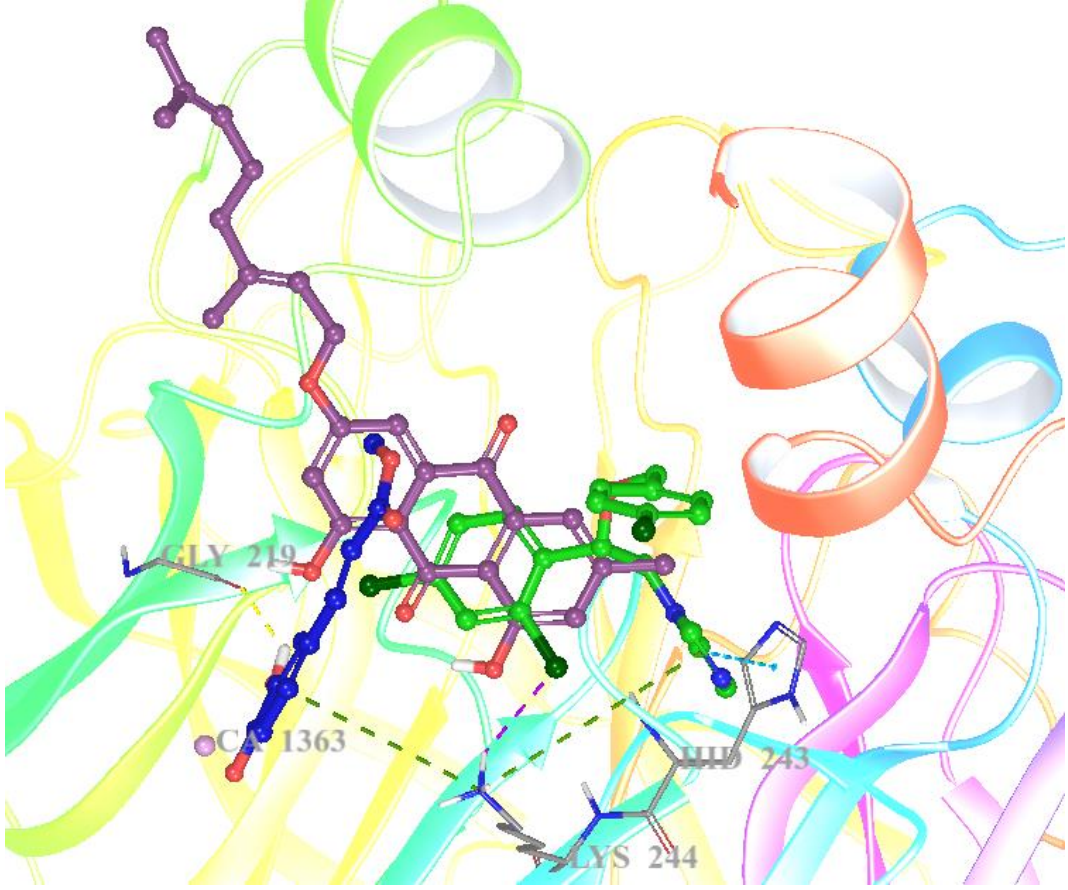


Şekil 5.28. *Thymus sibthorpii* bitkisinin etanollü ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Eriodiktiol-7-o-glukuronid ve B: Luteolin-7-glukozid bileşiklerinin etkileşimi

5.2.7. *Asphodeline taurica* bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



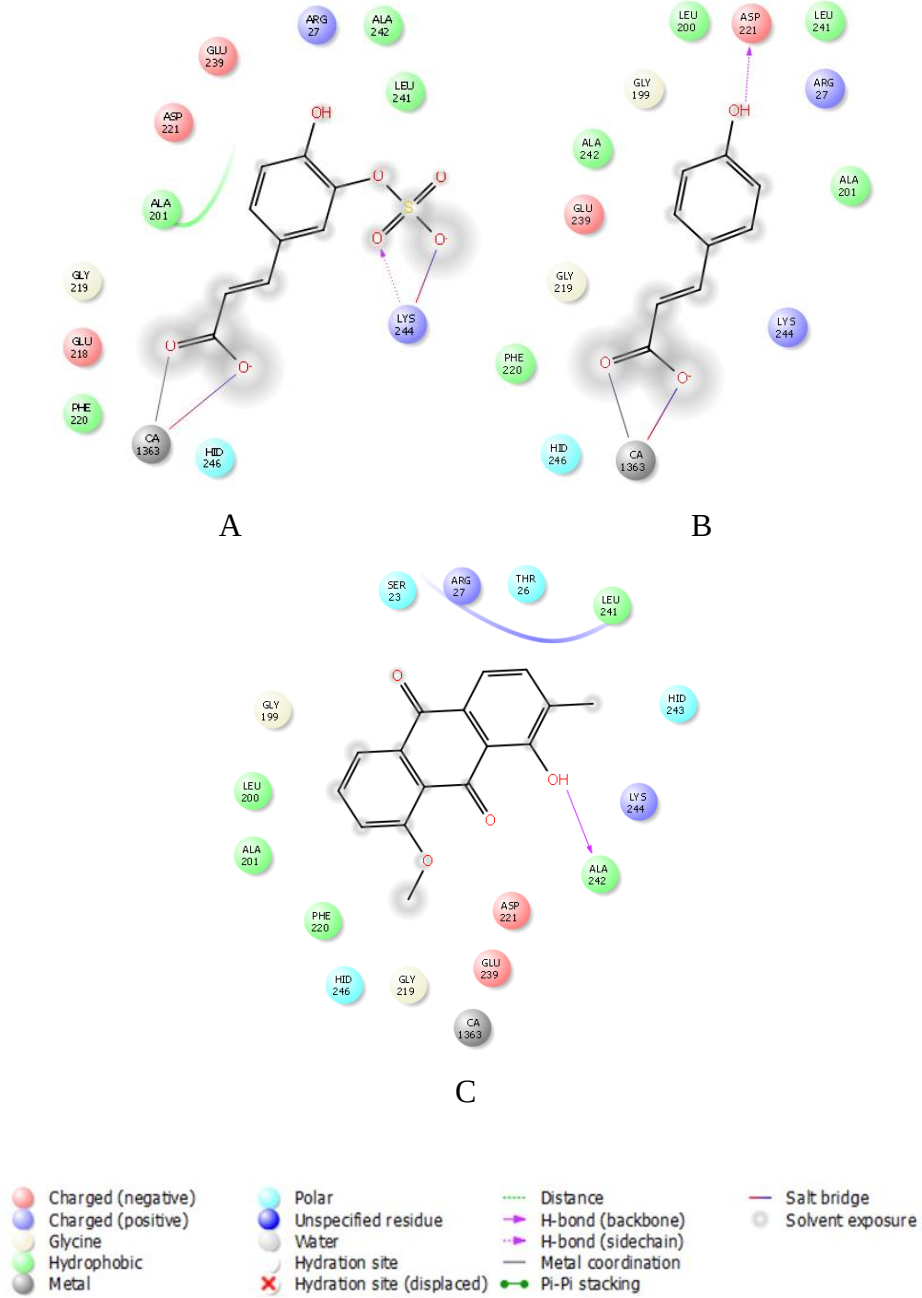
Şekil 5.29. A: Metil kafeik asit, B: Ekonazol ve C: Geraniloksiemodin bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi



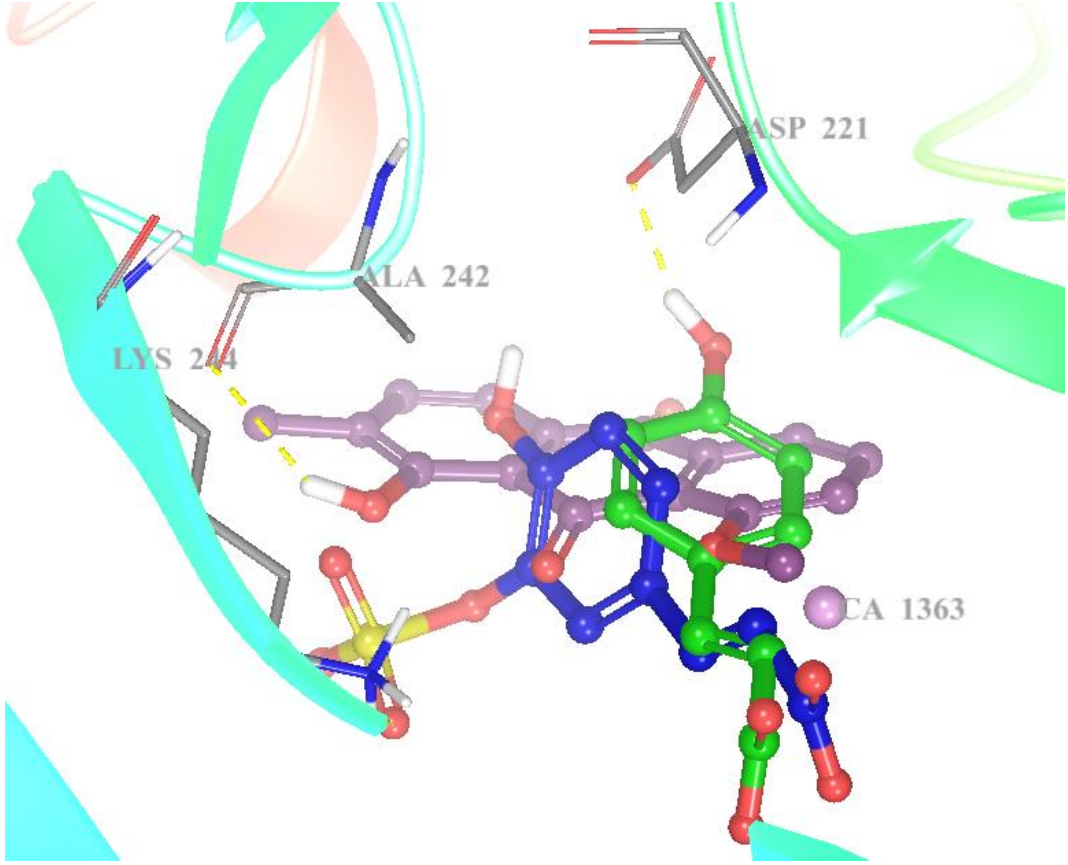
● Geranioloxiemodin ● Metil kafeik asit ● Ekonazol

Şekil 5.30. *Asphodeline taurica* bitkisinin sulu ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Metil kafeik asit, B: Ekonazol ve C: Geranioloxiemodin bileşiklerinin etkileşimi

5.2.8. *Asphodeline taurica* bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerle ilgili yapılan docking çalışmaları



Şekil 5.31. A: Kafeik asit-3-sülfat, B: p-Kumarik asit ve C: 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakinon bileşiklerinin PON1 enziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimi



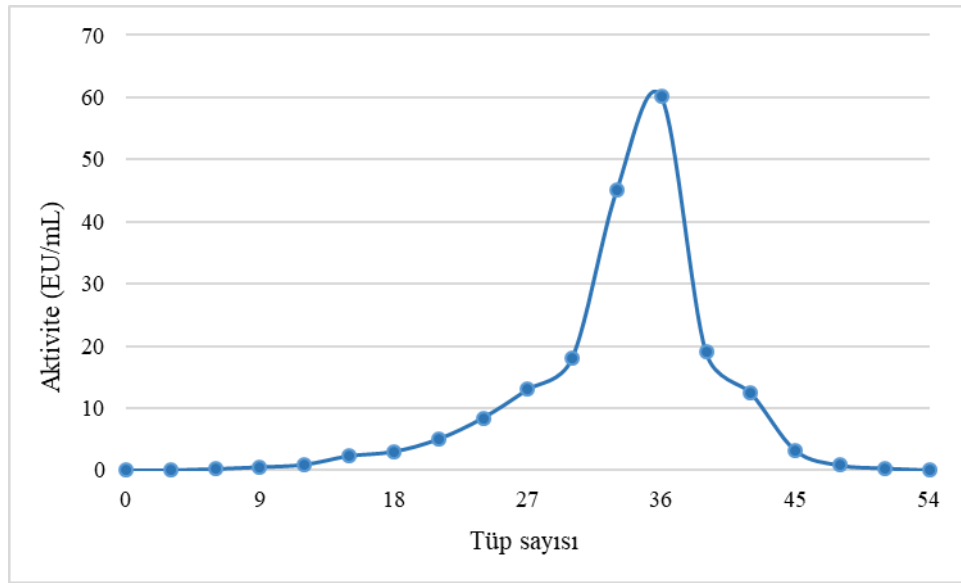
● 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakinon ● Kafeik asit-3-sülfat ● *p*-Kumarik asit

Şekil 5.32. *Asphodeline taurica* bitkisinin etanollü ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin PON1 enzimi (3SRG) ile A: Kafeik asit-3-sülfat, B: *p*-Kumarik asit ve C: 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrakinon bileşiklerinin etkileşimi

5.3. PON1 Enziminin Saflaştırma Sonuçları

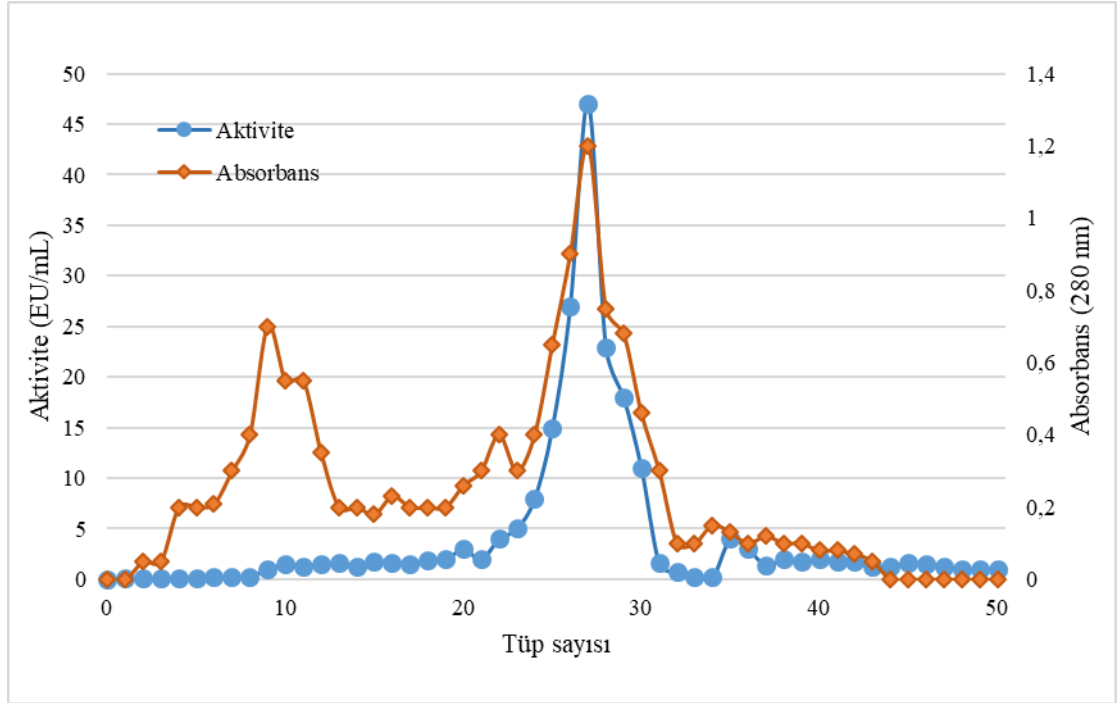
5.3.1. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi sonuçları

%60-80 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim numunesi diyaliz edildikten sonra DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolonuna tatbik edildi. Elüatlar 3 mL olarak toplandı. 280 nm ve 412 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek, toplanan tüp sayısına karşı aktivite grafiği çizildi (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. PON1 enziminin DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi aktivite grafiği

5.3.2. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi sonuçları



Şekil 5.34. PON1 enziminin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi aktivite/absorbans grafiği

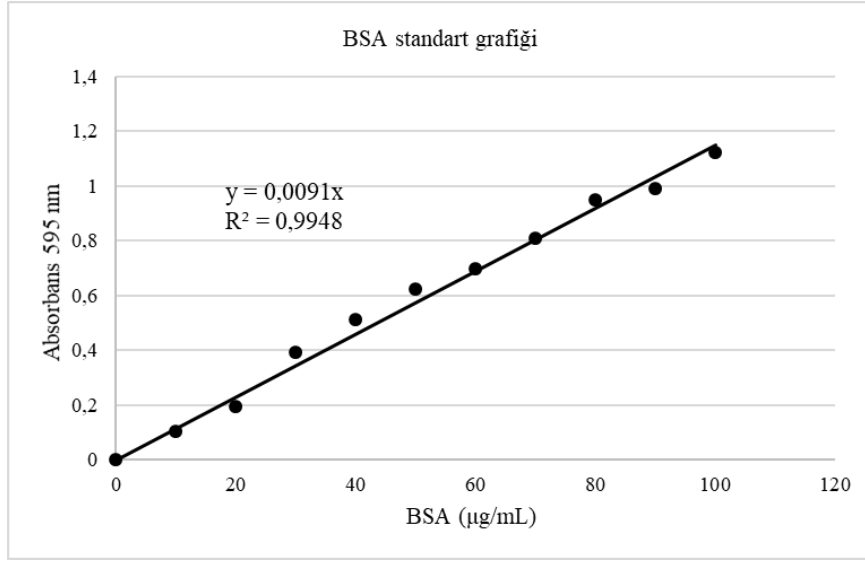
İnsan serumundan PON1 enziminin saflaştırılması aşamalarında kullanılan yöntemler sonunda elde edilen numunelerde protein miktarları ve aktivite (EÜ/mL) değerleri ölçülerek oluşturulan saflaştırma tablosu (tablo 5.1’de) aşağıda verilmiştir.

Tablo 5.1. İnsan serum PON1 enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Serum	102,78	25	3,13	78,25	2569,5	32,84	100	1
%60-80 Amonyum sülfat çöktürmesi (Diyaliz)	97,32	10	2,95	29,5	973,2	32,99	37,88	1,004
DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi	60,14	6	0,15	0,90	360,84	400,9	14,04	12,21
Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi	47,02	3	0,018	0,054	141,06	2612,22	5,49	79,54

5.3.3. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

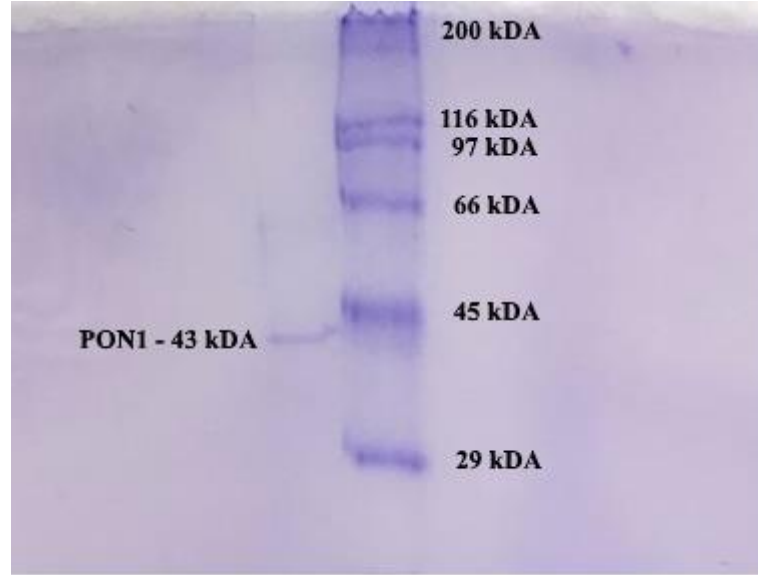
Serumda, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kolon kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrasında enzim numunesindeki protein miktarı, Bovin serum albümin (BSA) standart grafiği kullanılarak Bradford yöntemiyle tayin edildi.



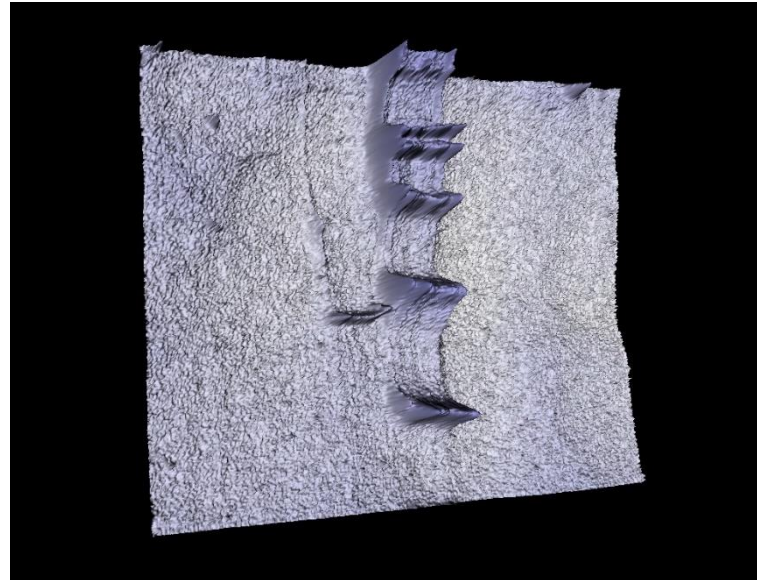
Şekil 5.35. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği

5.3.4. SDS –Poliakrilamid jel elektroforezi ile PON1 enziminin saflığının kontrolü

Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin saflığının kontrolü SDS –Poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlendi.



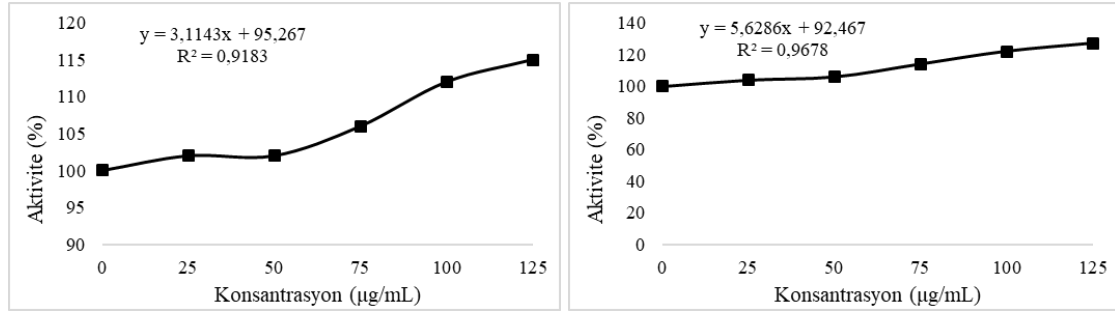
Şekil 5.36. PON1 enziminin SDS-PAGE fotoğrafı



Şekil 5.37. PON1 enziminin SDS-PAGE üç boyutlu fotoğrafı

5.4. İnsan Serum PON1 İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin İncelenmesi Sonuçları

5.4.1. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Crataegus tanacetifolia* ekstrelerinin etkileri

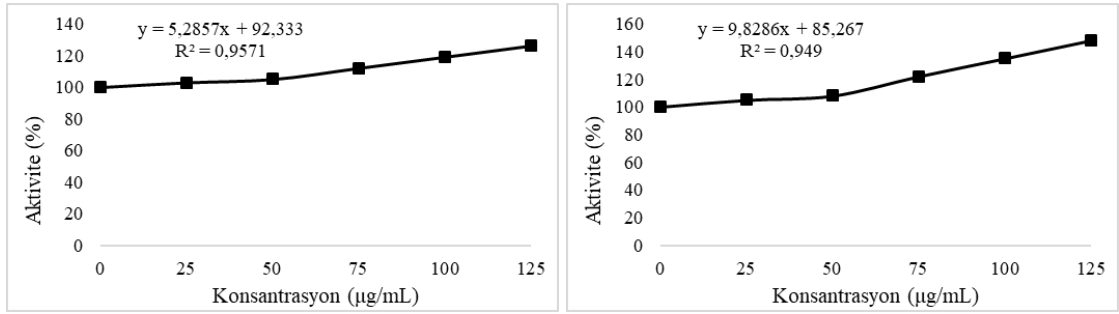


Şekil 5.38. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği

Tablo 5.2. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin r^2 ve aktivite (%) değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Sulu ekstre		Etanollü ekstre	
	r^2	Aktivite (%)	r^2	Aktivite (%)
25	0,9183	102	0,9678	104
50		102		106
75		106		114
100		112		122
125		115		127

5.4.2. *Rumex acetosella* ekstralarının PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri

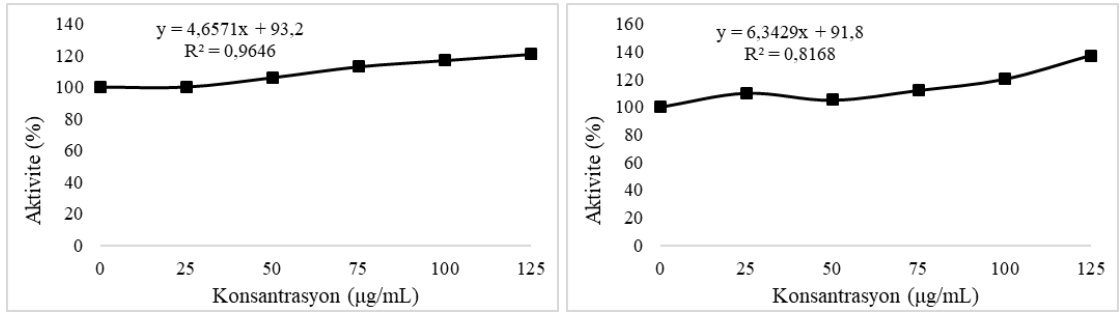


Şekil 5.39. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Rumex acetosella* bitkisinin su ve etanol ekstralarının etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği

Tablo 5.3. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Rumex acetosella* bitkisinin su ve etanol ekstralarının r^2 ve aktivite (%) değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Sulu ekstre		Etanollü ekstre	
	r^2	Aktivite (%)	r^2	Aktivite (%)
25		103		105
50		105		108
75	0,9571	112	0,9490	122
100		119		135
125		126		148

5.4.3. *Thymus sibthorpii* ekstrelerinin PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri

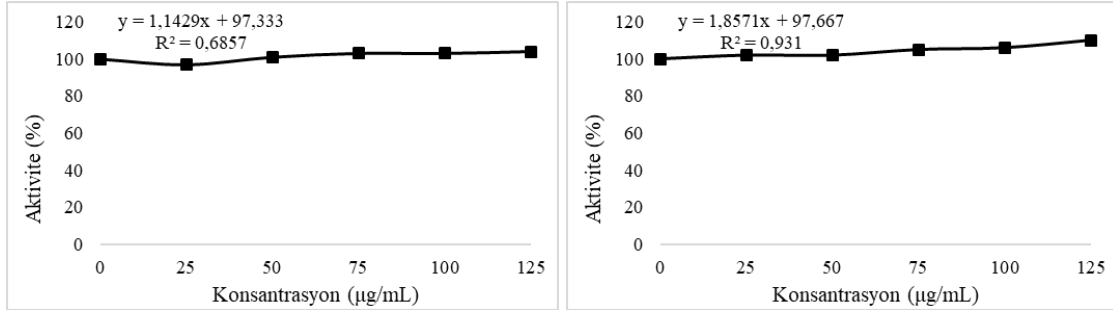


Şekil 5.40. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Thymus sibthorpii* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği

Tablo 5.4. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Thymus sibthorpii* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin r^2 ve aktivite (%) değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Sulu ekstre		Etanollü ekstre	
	r^2	Aktivite (%)	r^2	Aktivite (%)
25	0,9646	100	0,8168	110
50		106		105
75		113		112
100		117		120
125		121		137

5.4.4. *Asphodeline taurica* ekstrelerinin PON1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri



Şekil 5.41. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Asphodeline taurica* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin etkisini gösteren ve aktivite (%) değerinin belirlenmesinde kullanılan [Aktivite(%)] - [Ekstre] grafiği

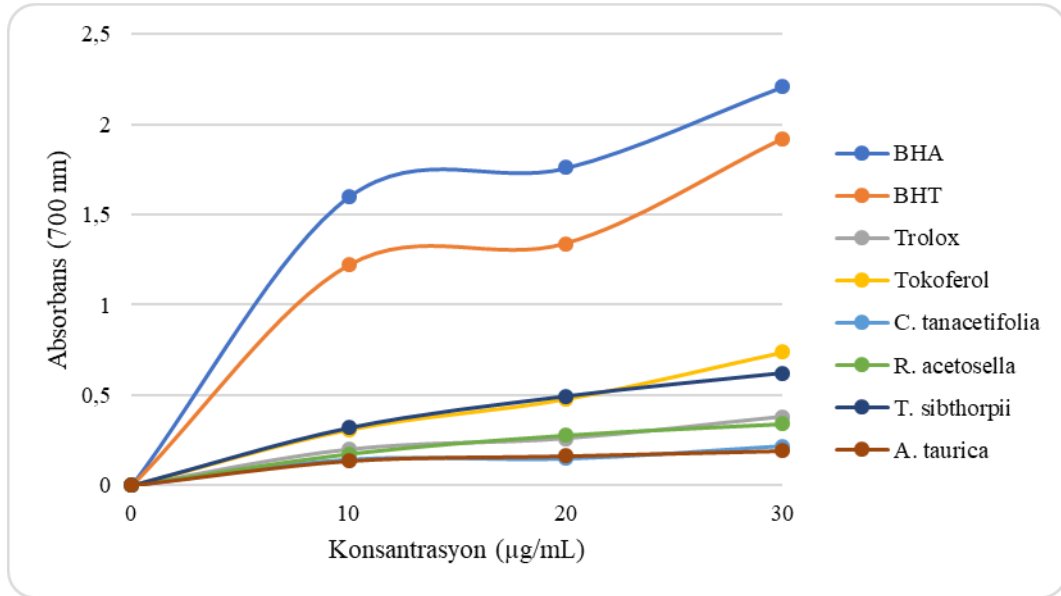
Tablo 5.5. İnsan serum PON1 izoenzimi aktivitesi üzerine *Asphodeline taurica* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin r^2 ve aktivite (%) değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Sulu ekstre		Etanollü ekstre	
	r^2	Aktivite (%)	r^2	Aktivite (%)
25		97		102
50		101		102
75	0,6857	103	0,9310	105
100		103		106
125		104		110

5.5. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

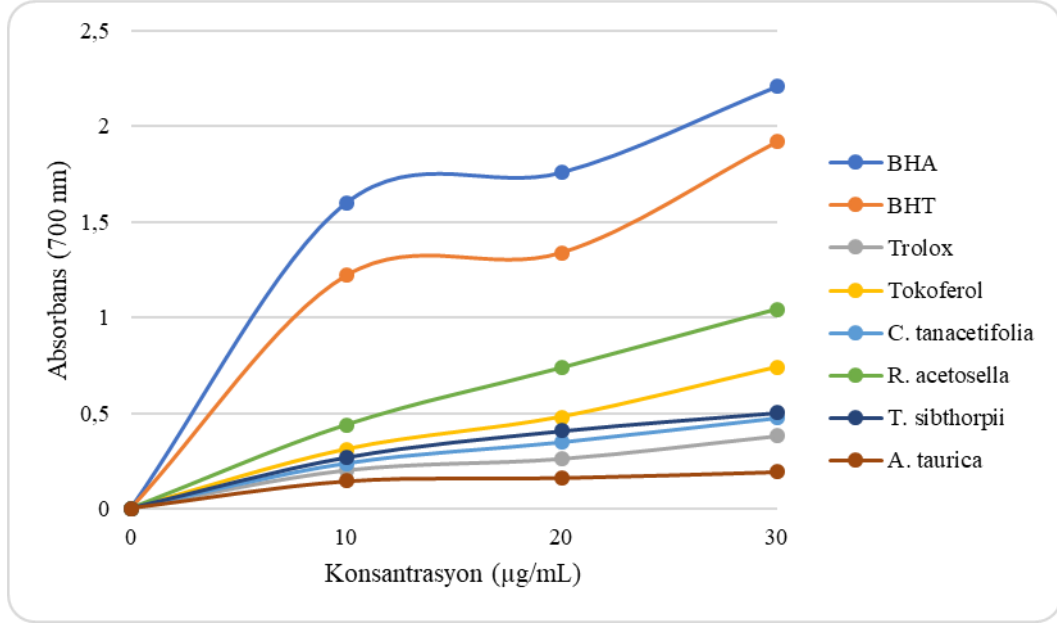
5.5.1. Demir indirgeme kuvveti tayini (Fe^{3+} - Fe^{2+})

Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) alınarak Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasiteleri belirlendi. Demir indirgeme metodunda çözeltinin sarı olan rengi, ortamdaki maddelerin antioksidan kapasitesine göre yeşil ve mavi renge dönüştü. Hazırlanan bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 700 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.42 ve Şekil 5.43’te gösterildi.



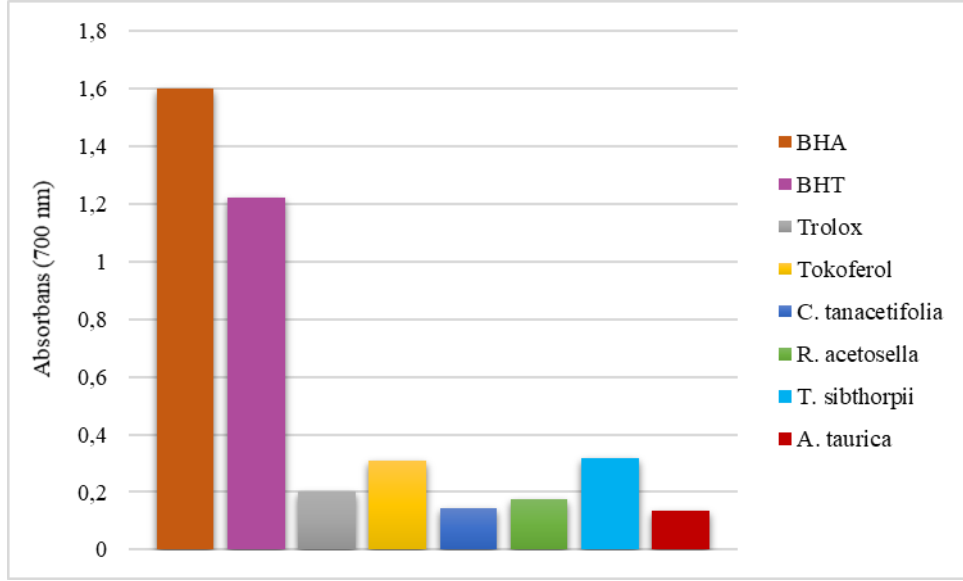
Şekil 5.42. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) sulu bitki ekstraktlarının Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.42’deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin sulu bitki ekstraktlarında 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon için sırasıyla BHA > BHT > *T. sibthorpii* > α -Tokoferol > Trolox > *R. acetosella* > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* olduğu görülmüştür.

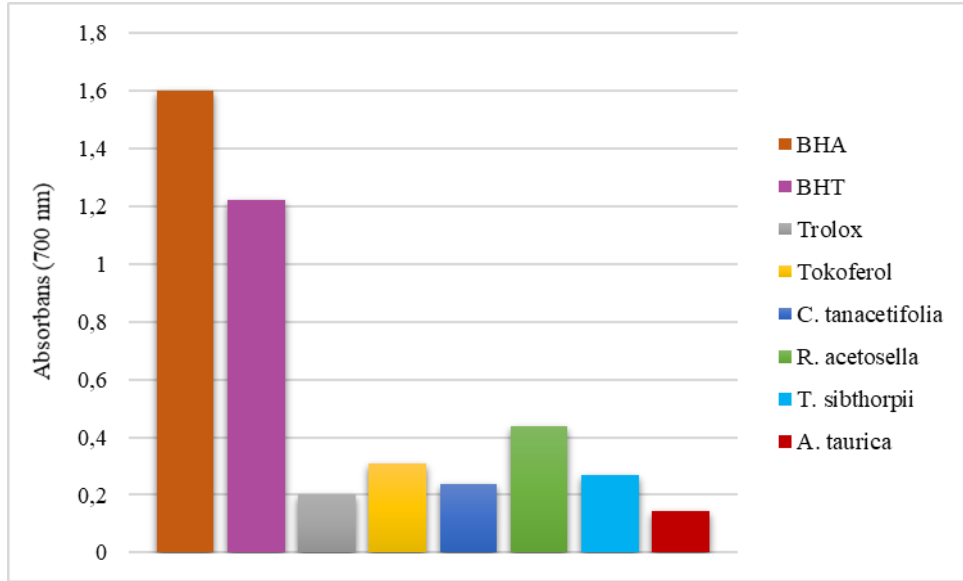


Şekil 5.43. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.43'teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > BHT > R. acetosella > α -Tokoferol > T. sibthorpii > C. tanacetifolia > Trolox > A. taurica olduğu görülmüştür.



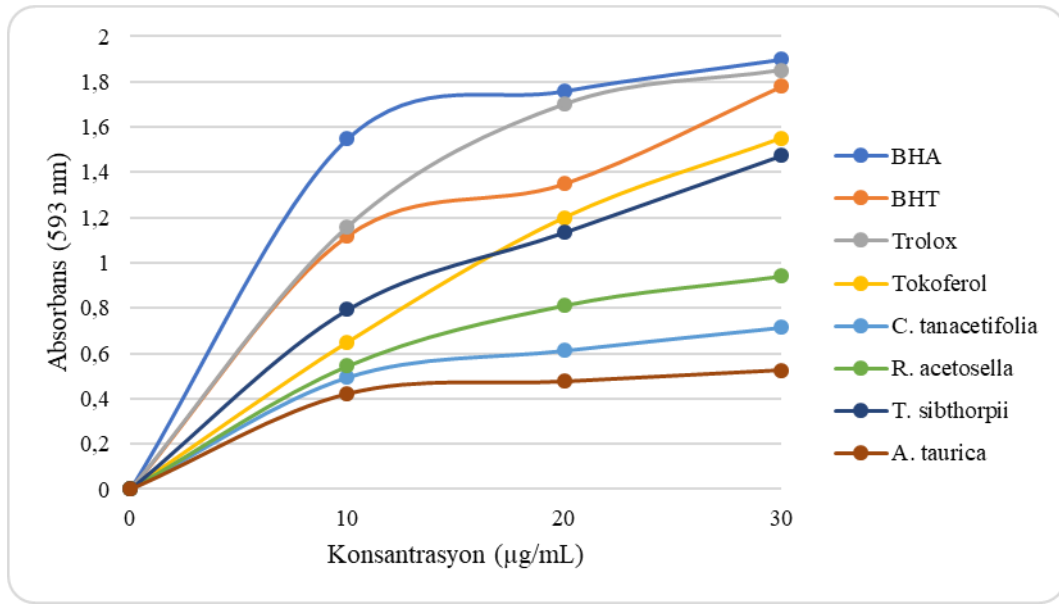
Şekil 5.44. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.45. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

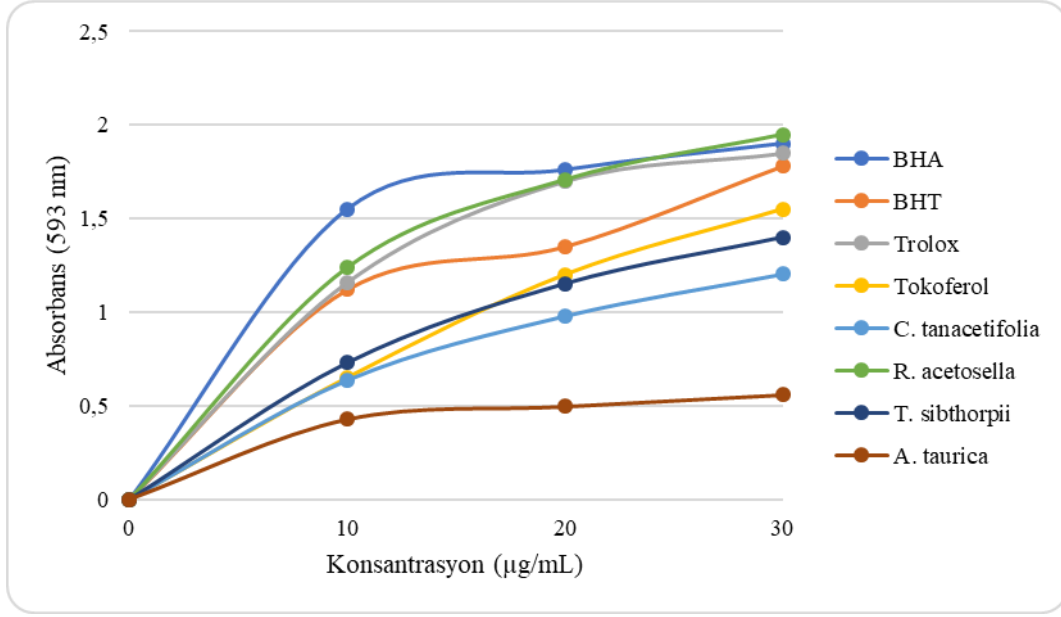
5.5.2. FRAP metodu

FRAP metodunda ortamda bulunan indirgeyici moleküller sayesinde Fe^{3+} iyonlarından elektron verilerek Fe^{2+} oluşur ve bu iyonlar TPTZ ile mavi renkli kompleks meydana getirir. Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu g/mL$) alınarak Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasiteleri belirlendi. Hazırlanan bitki ekstrelerinin ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 593 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.46 ve Şekil 5.47’da gösterildi.



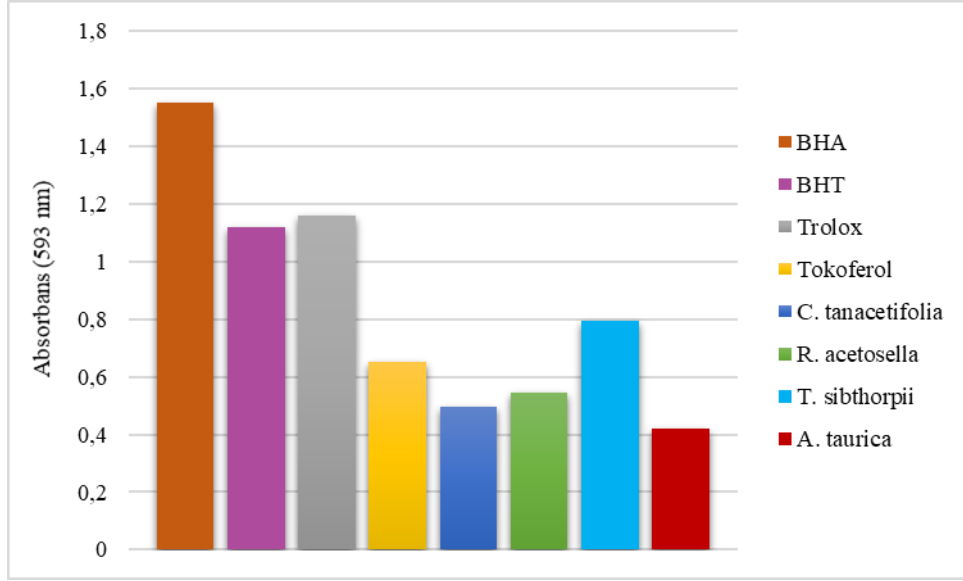
Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 $\mu g/mL$) sulu bitki ekstrelerinin FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz (Fe^{2+}) iyonlarına indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.46’daki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin sulu bitki ekstrelerinde 10 $\mu g/mL$ konsantrasyon için sırasıyla BHA > Trolox > BHT > *T. sibthorpii* > α -Tokoferol > *R. acetosella* > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* olduğu görülmüştür.

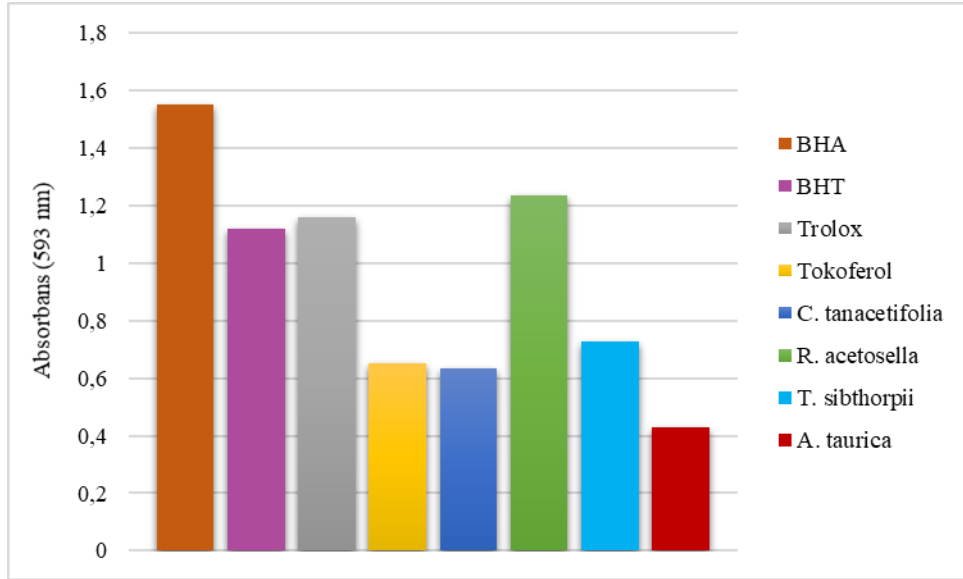


Şekil 5.47. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz (Fe^{2+}) iyonlarına indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.47'deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > Trolox > BHT > *R. acetosella* > *T. sibthorpii* > α -Tokoferol > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* olduğu görülmüştür.



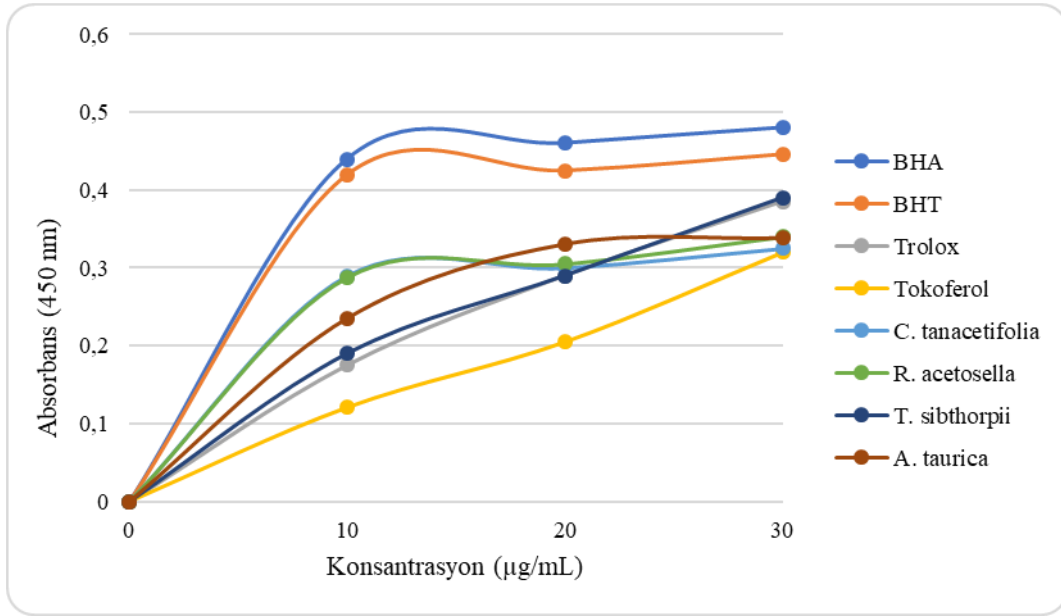
Şekil 5.48. FRAP reaktifi ile sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz (Fe^{2+}) iyonlarına indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.49. FRAP reaktifi ile etanolü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz (Fe^{2+}) iyonlarına indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

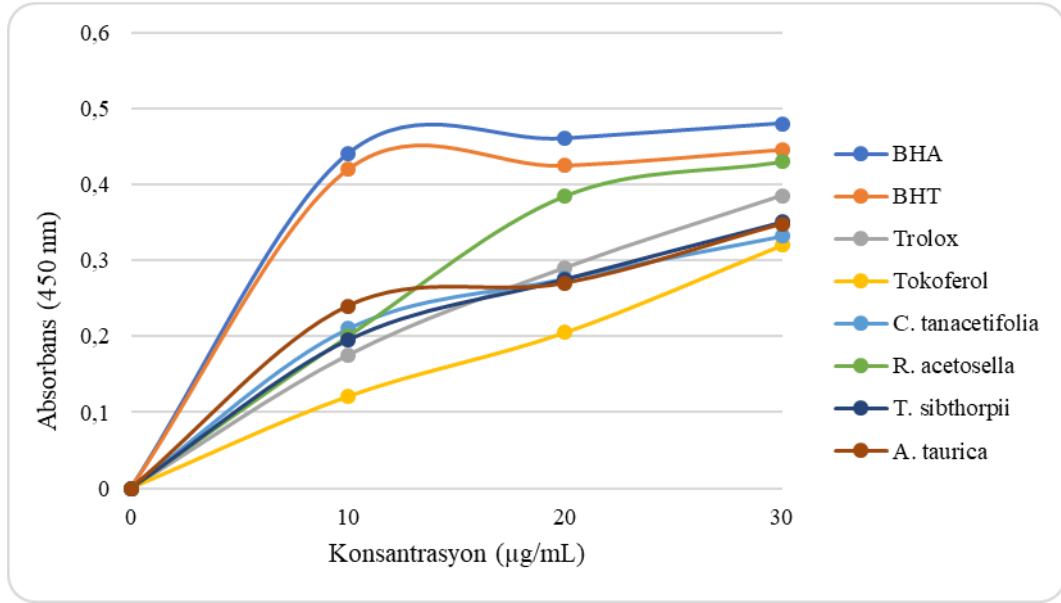
5.5.3. CUPRAC metodu

Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasiteleri CUPRAC metodu ile belirlendi. Hazırlanan bitki ekstrelerinin ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.50 ve Şekil 5.51’de gösterildi.



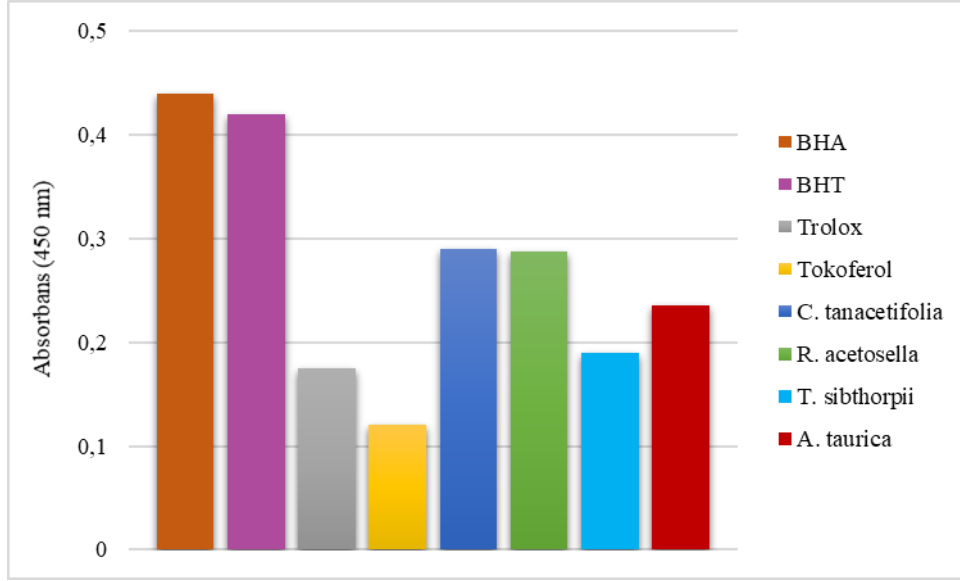
Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstrelerinin Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.50’deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Cu^{2+} iyonlarını Cu^{+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin sulu bitki ekstrelerinde 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > BHT > C. tanacetifolia > R. acetosella > A. taurica > T. sibthorpii > Trolox > α -Tokoferol olduğu görülmüştür.

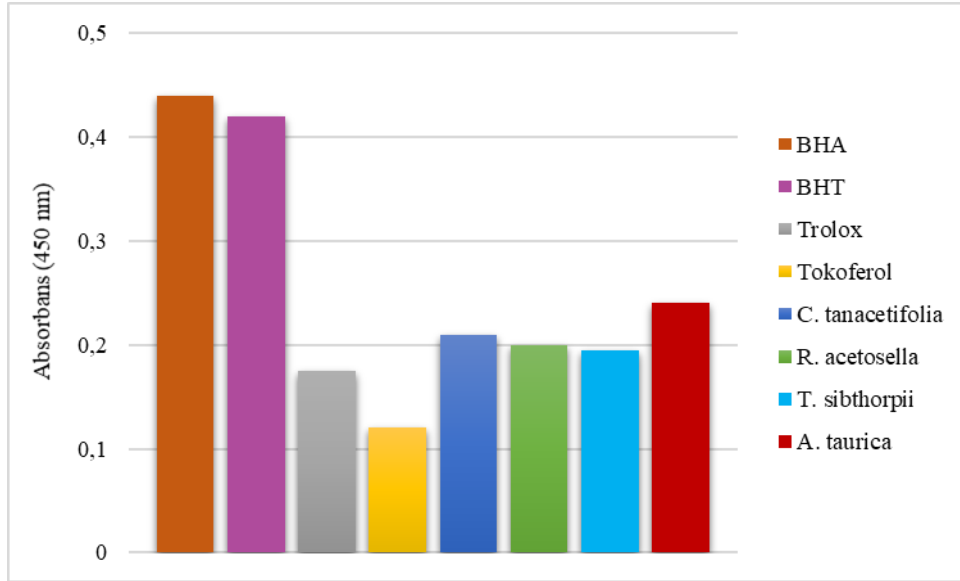


Şekil 5.51. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.51'deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında Cu^{2+} iyonlarını Cu^{+} iyonlarına indirgeme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > BHT > A. taurica > C. tanacetifolia > R. acetosella > T. sibthorpii > Trolox > α -Tokoferol olduğu görülmüştür.



Şekil 5.52. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



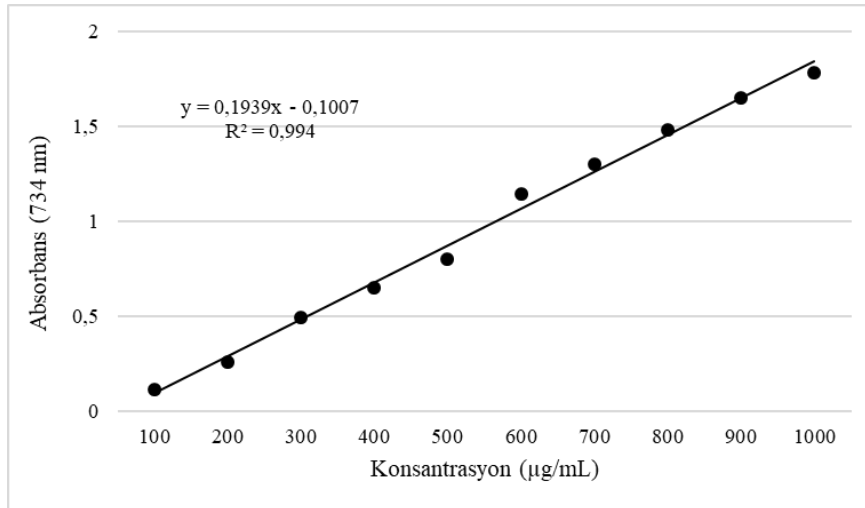
Şekil 5.53. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

5.5.4. ABTS radikali (ABTS^{•+}) giderme aktivitesi tayini

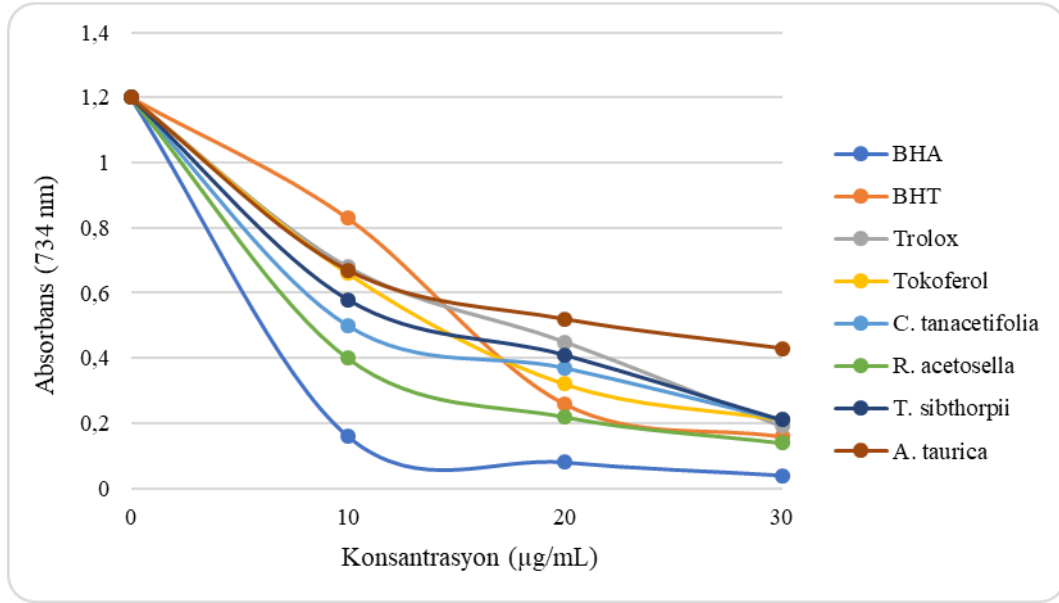
ABTS radikali giderme aktivitesi tayininden hemen önce ABTS^{•+} için standart grafik oluşturuldu (Şekil 5.54). Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak ABTS radikali giderme aktivitesi tayini yapıldı ve sonrasında ise ortamda kalan ABTS^{•+} miktarı belirlendi. Hazırlanan bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 734 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.55 ve Şekil 5.56’da gösterildi.

ABTS radikali giderme aktivitesi yüzde (%) değer olarak aşağıda verilen denklemden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left[1 - \frac{\lambda_{N734}}{\lambda_{K734}} \right] \times 100$$

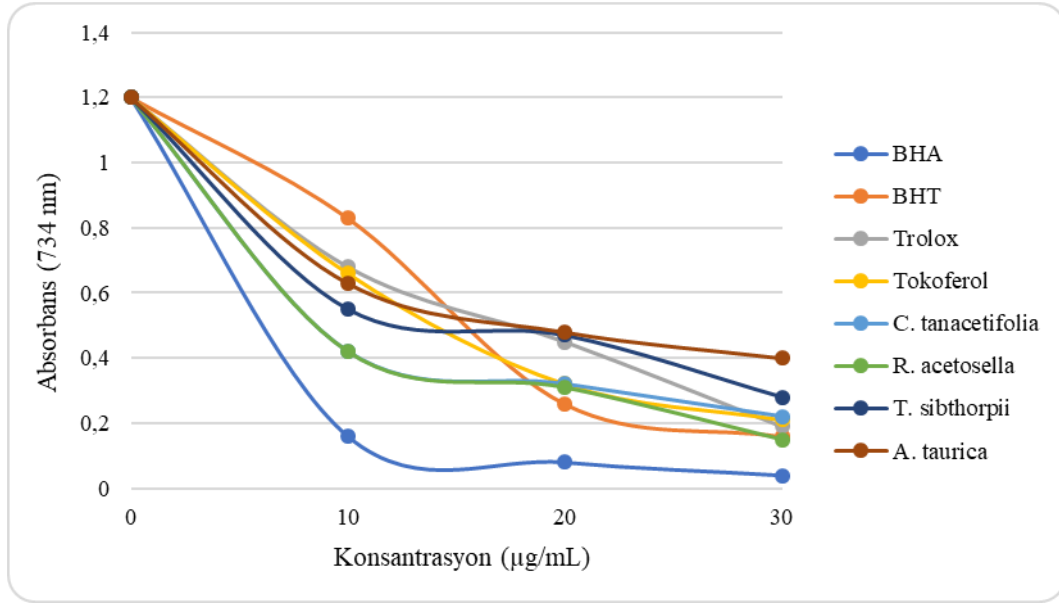


Şekil 5.54. ABTS serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart ABTS^{•+} grafiği



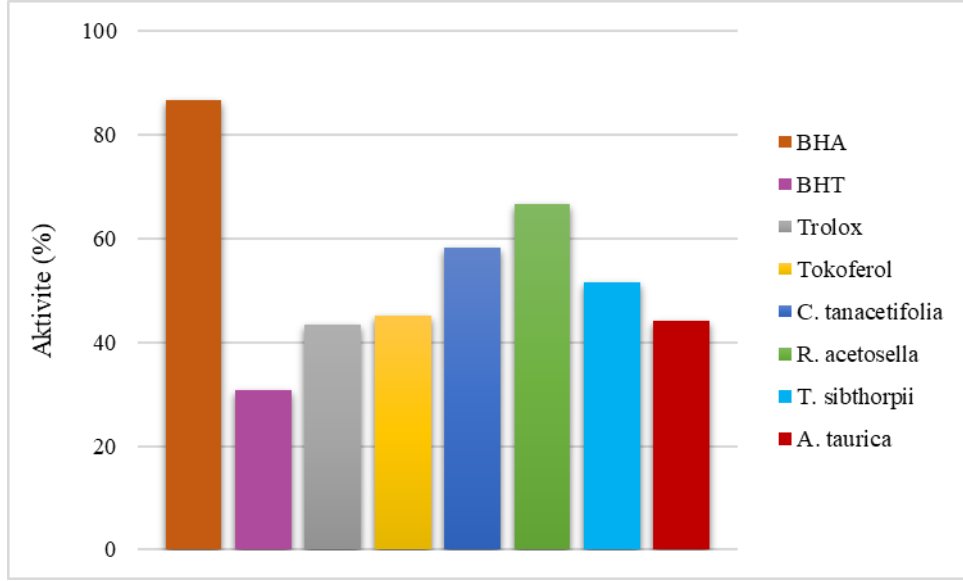
Şekil 5.55. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının ABTS radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.55'teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstralarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan ABTS^{•+} miktarı azaldı. ABTS^{•+} giderme kapasitesinin sulu bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > R. acetosella > C. tanacetifolia > T. sibthorpii > α -Tokoferol > A. taurica > Trolox > BHT olduğu görülmüştür.

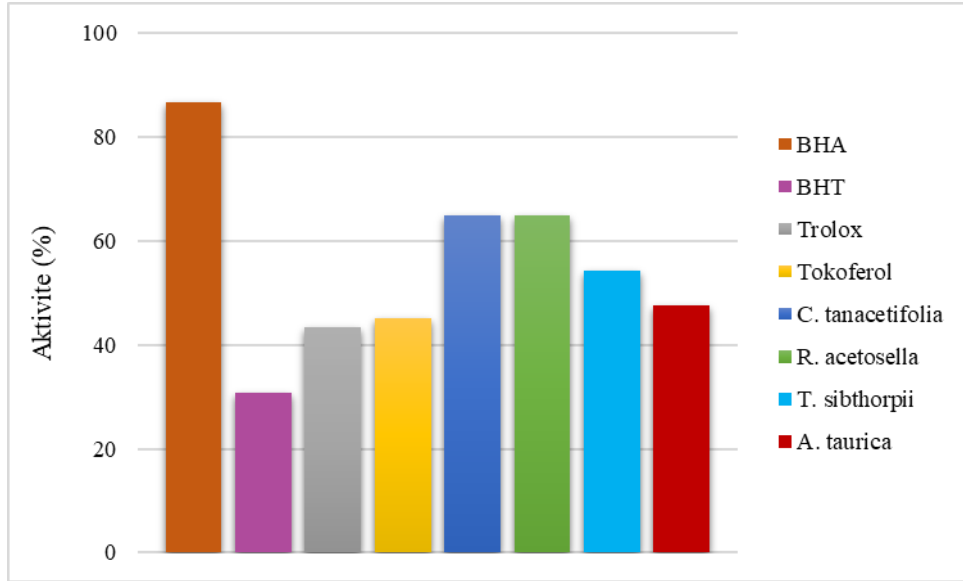


Şekil 5.56. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının ABTS radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.56'daki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstralarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan ABTS^{•+} miktarı azaldı. ABTS^{•+} giderme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > R. acetosella > C. tanacetifolia > T. sibthorpii > A. taurica > α -Tokoferol > Trolox > BHT olduğu görülmüştür.



Şekil 5.57. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



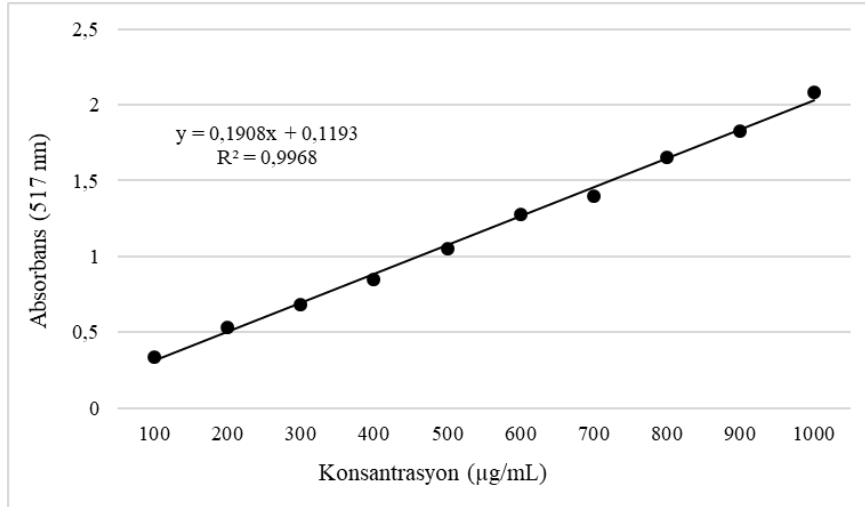
Şekil 5.58. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.5. DPPH serbest radikal (DPPH•) giderme aktivitesi tayini

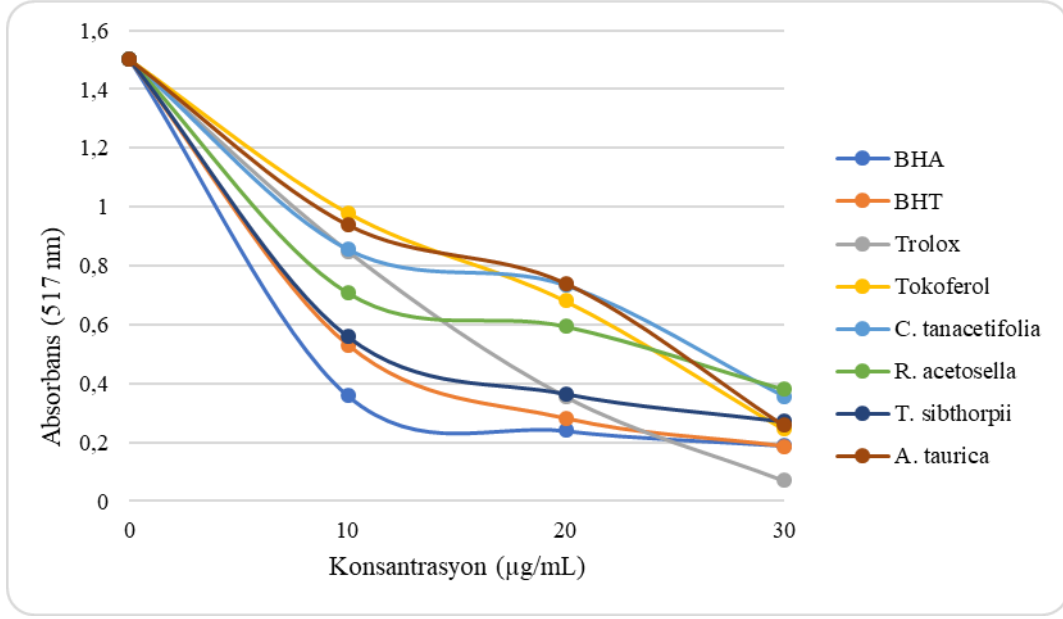
DPPH radikali giderme kapasitesi tayininden hemen önce DPPH• için standart grafik oluşturuldu (Şekil 5.59). Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak DPPH radikali giderme tayini yapıldı ve sonrasında ise ortamda kalan serbest radikal miktarı belirlendi. Hazırlanan bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 517 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.60 ve Şekil 5.61’te gösterildi.

DPPH radikali giderme aktivitesi yüzde (%) değer olarak aşağıda verilen denklemden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{DPPH• giderme aktivitesi (\%)} = \left[1 - \frac{\lambda_{N517}}{\lambda_{K517}} \right] \times 100$$

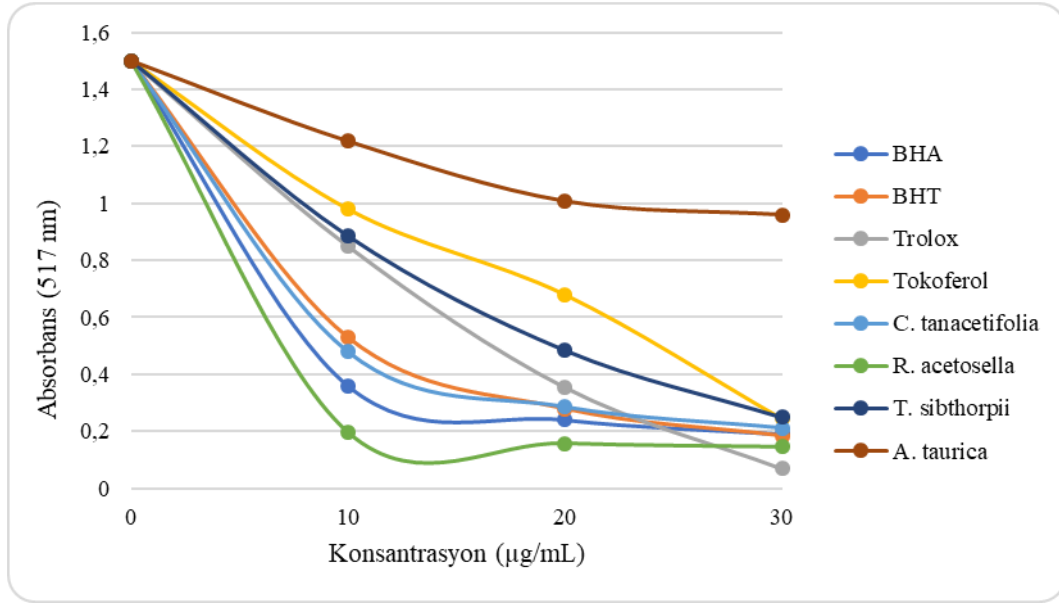


Şekil 5.59. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DPPH• grafiği



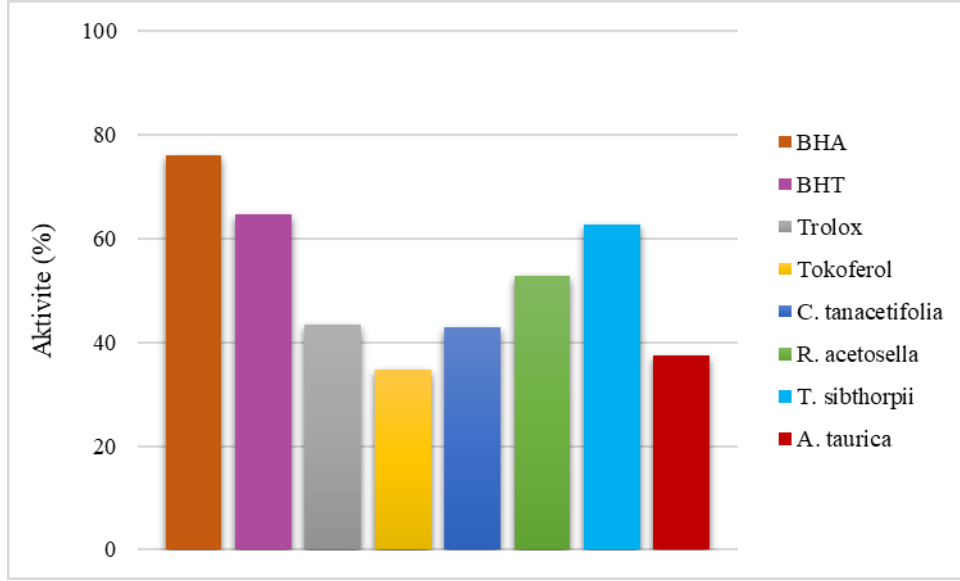
Şekil 5.60. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstrlerinin DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.60'taki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstrlerinin ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan DPPH• miktarı azaldı. DPPH• giderme kapasitesinin sulu bitki ekstrlerinde 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > BHT > *T. sibthorpii* > *R. acetosella* > Trolox > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* > α-Tokoferol olduğu görülmüştür.

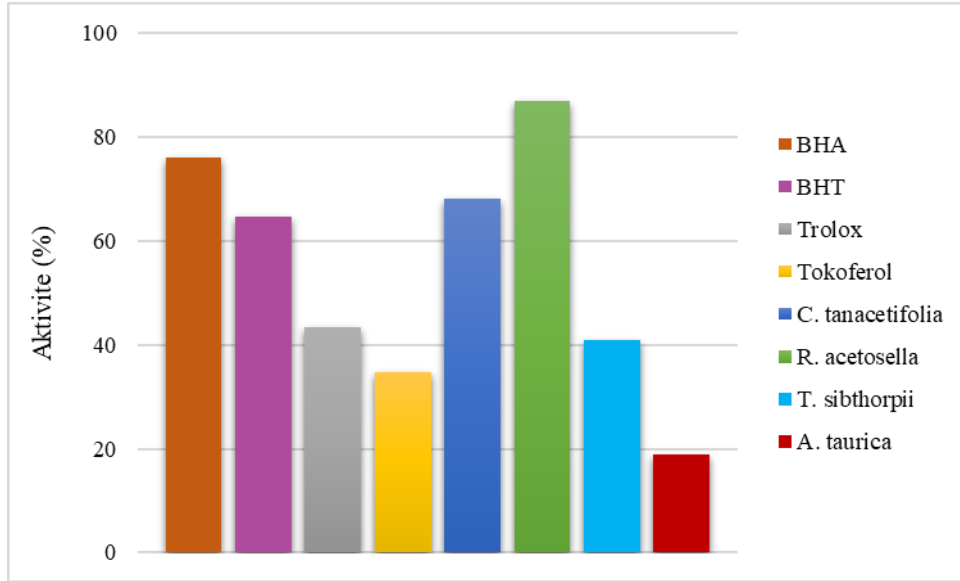


Şekil 5.61. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstraktlarının DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.61'deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan DPPH• miktarı azaldı. DPPH• giderme kapasitesinin etanollü bitki ekstraktlarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla *R. acetosella* > BHA > BHT > *C. tanacetifolia* > Trolox > *T. sibthorpii* > α-Tokoferol > *A. taurica* olduğu görülmüştür.



Şekil 5.62. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



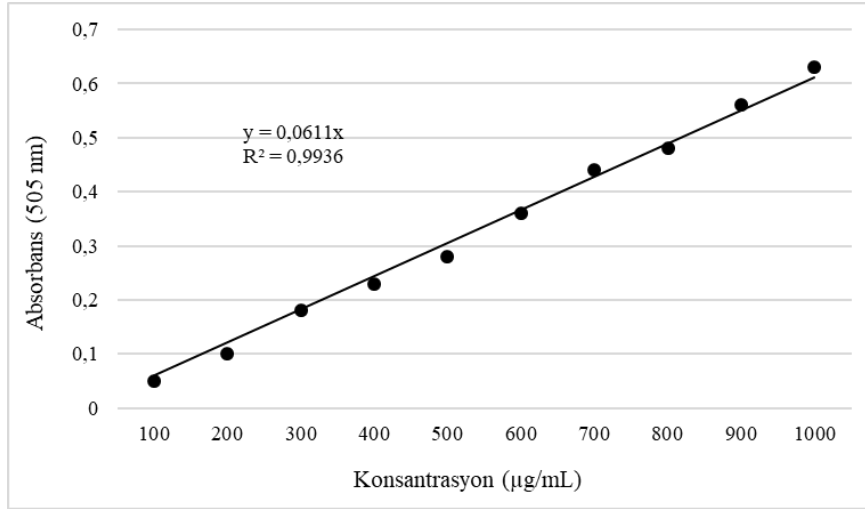
Şekil 5.63. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.6. DMPD radikali (DMPD^{•+}) giderme aktivitesi tayini

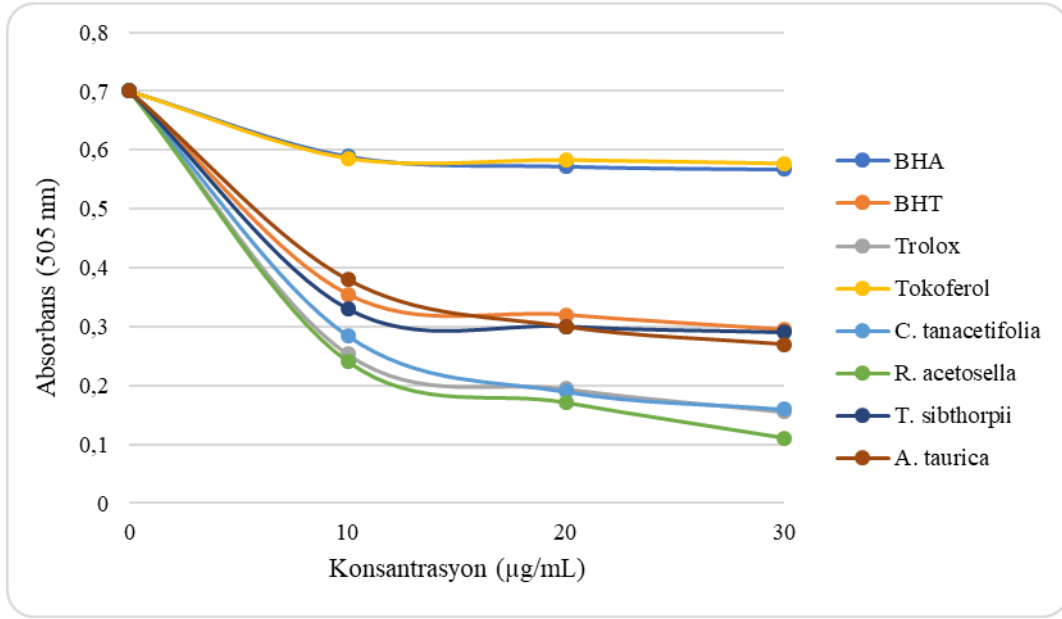
DMPD serbest radikali giderme aktivitesi tayininden önce ilk olarak DMPD^{•+} standart grafiği oluşturuldu (Şekil 5.64). Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak DMPD radikali giderme aktivitesi belirlendi. Hazırlanan bitki ekstrelerinin ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 505 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.65 ve Şekil 5.66’te gösterildi.

DMPD radikali giderme aktivitesi yüzde (%) değer olarak aşağıda verilen denklemden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{DMPD}^{\bullet+} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left[1 - \frac{\lambda_{N505}}{\lambda_{K505}} \right] \times 100$$

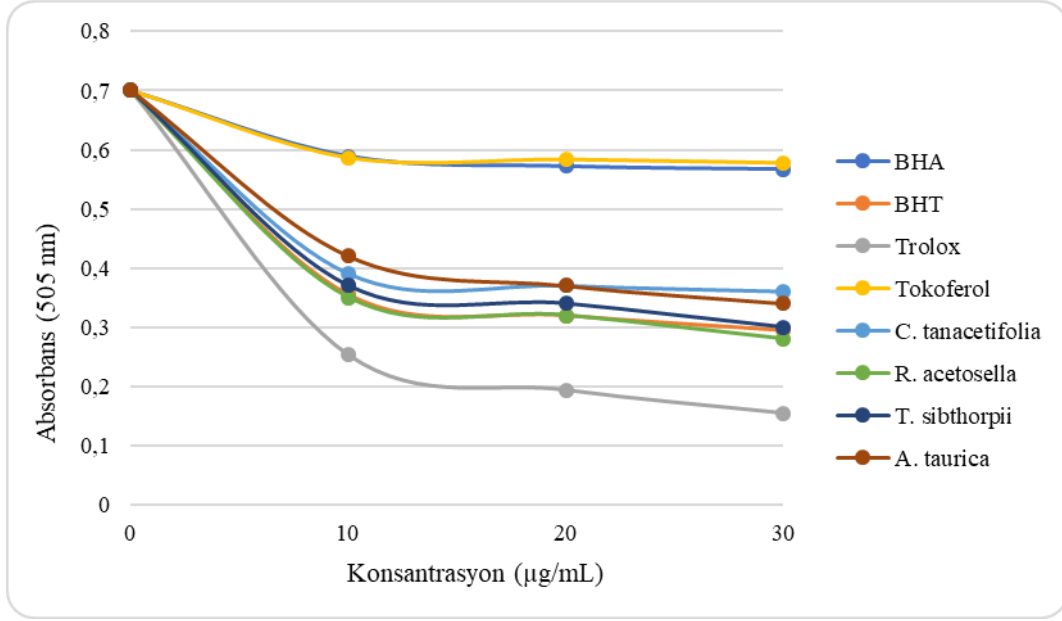


Şekil 5.64. DMPD serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DMPD^{•+} grafiği



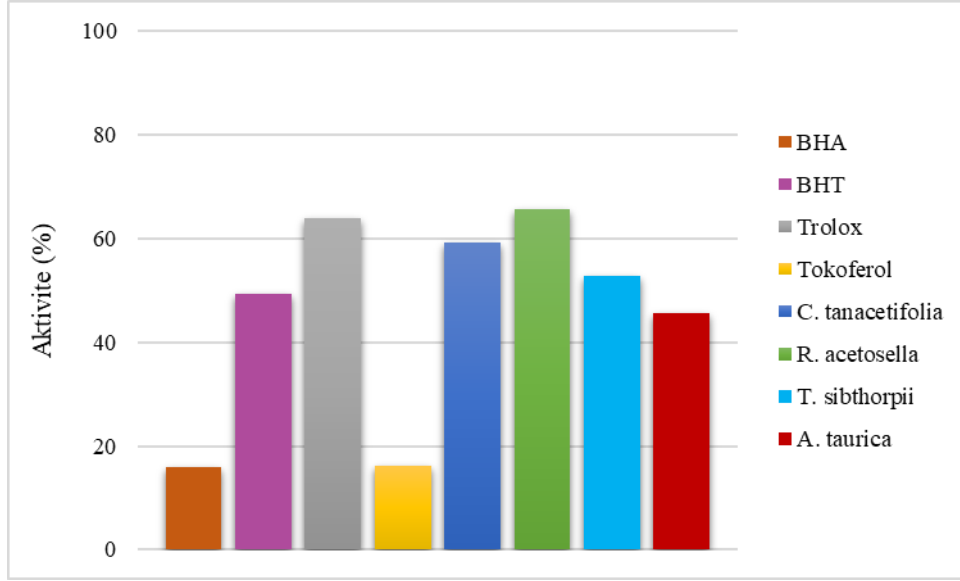
Şekil 5.65. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstralarının DMPD serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.65'teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstralarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan $DMPD^{•+}$ miktarı azaldı. $DMPD^{•+}$ giderme kapasitesinin sulu bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla *R. acetosella* > *C. tanacetifolia* > Trolox > *T. sibthorpii* > BHT > *A. taurica* > α-Tokoferol > BHA olduğu görülmüştür.

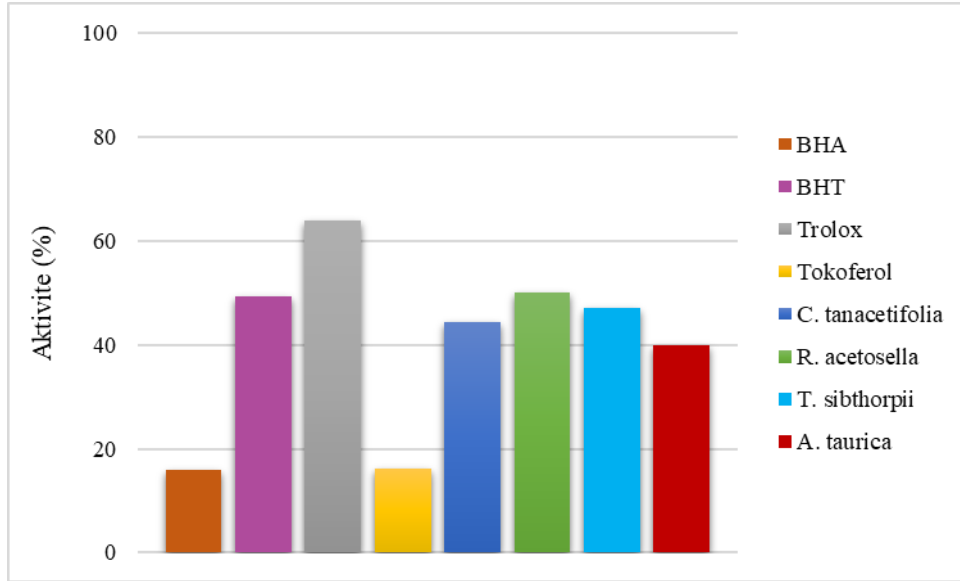


Şekil 5.66. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının DMPD serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.66'daki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstralarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan $DMPD^{*+}$ miktarı azaldı. $DMPD^{*+}$ giderme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla Trolox > *R. acetosella* > BHT > *T. sibthorpii* > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* > α -Tokoferol > BHA olduğu görülmüştür.



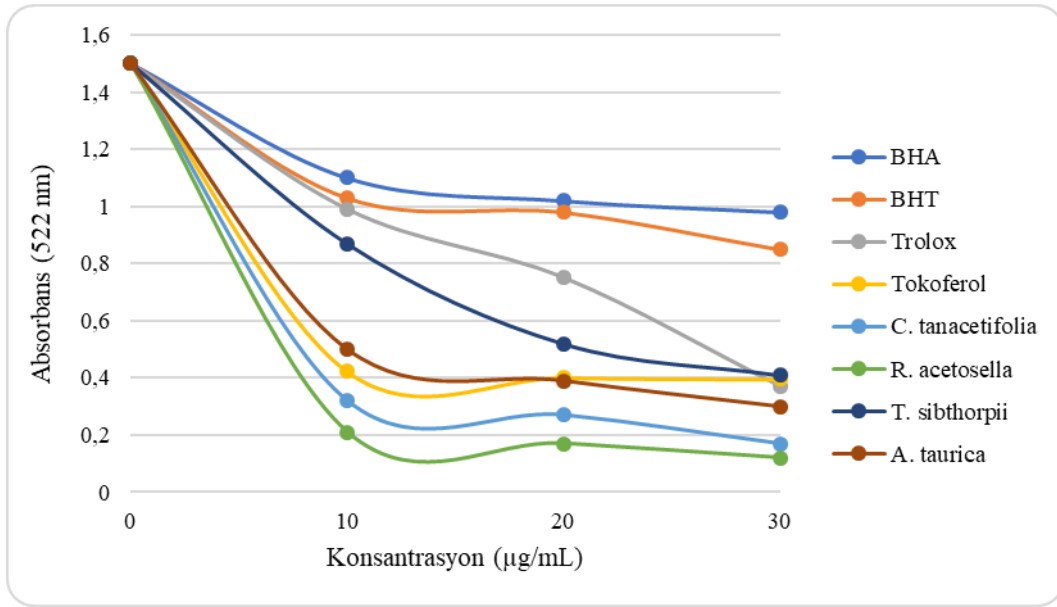
Şekil 5.67. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.68. Etanolü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

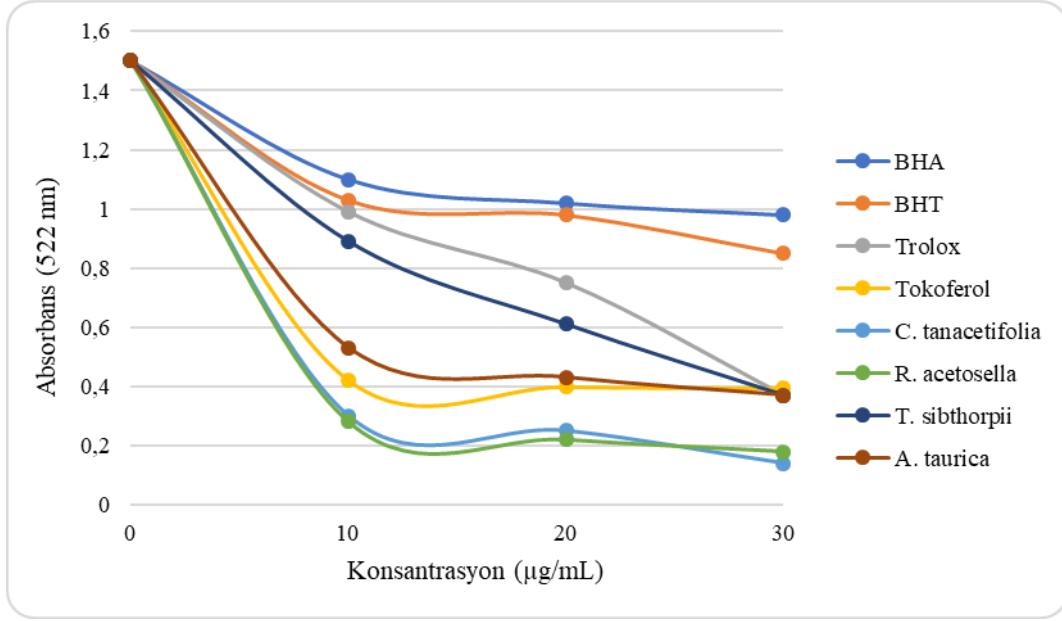
5.5.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini

Bipiridil reaktifi kullanılarak ve çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini yapıldı. Hazırlanan bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 522 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.69 ve Şekil 5.70’de gösterildi.



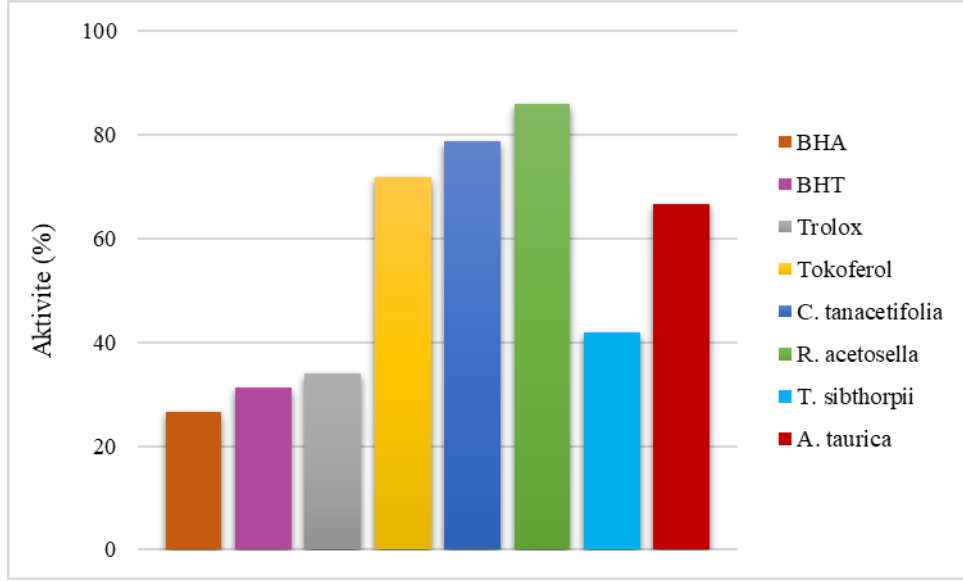
Şekil 5.69. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstraktlarının metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.69’deki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. Bipiridil metal şelatlama aktivitesinin sulu bitki ekstraktlarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla *R. acetosella* > *C. tanacetifolia* > α-Tokoferol > *A. taurica* > *T. sibthorpii* > Trolox > BHT > BHA olduğu görülmüştür.

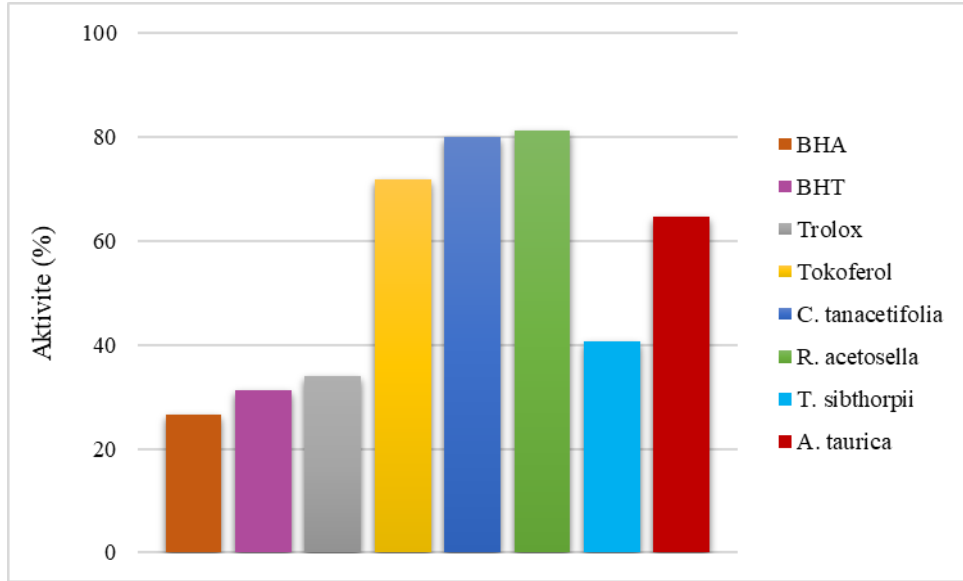


Şekil 5.70. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstrlerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.70'teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında bitki ekstrlerinin ve standart antioksidanların konsantrasyonları arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. Bipiridil metal şelatlama aktivitesinin etanollü bitki ekstrlerinde 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla *R. acetosella* > *C. tanacetifolia* > α -Tokoferol > *A. taurica* > *T. sibthorpii* > Trolox > BHT > BHA olduğu görülmüştür.



Şekil 5.71. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması



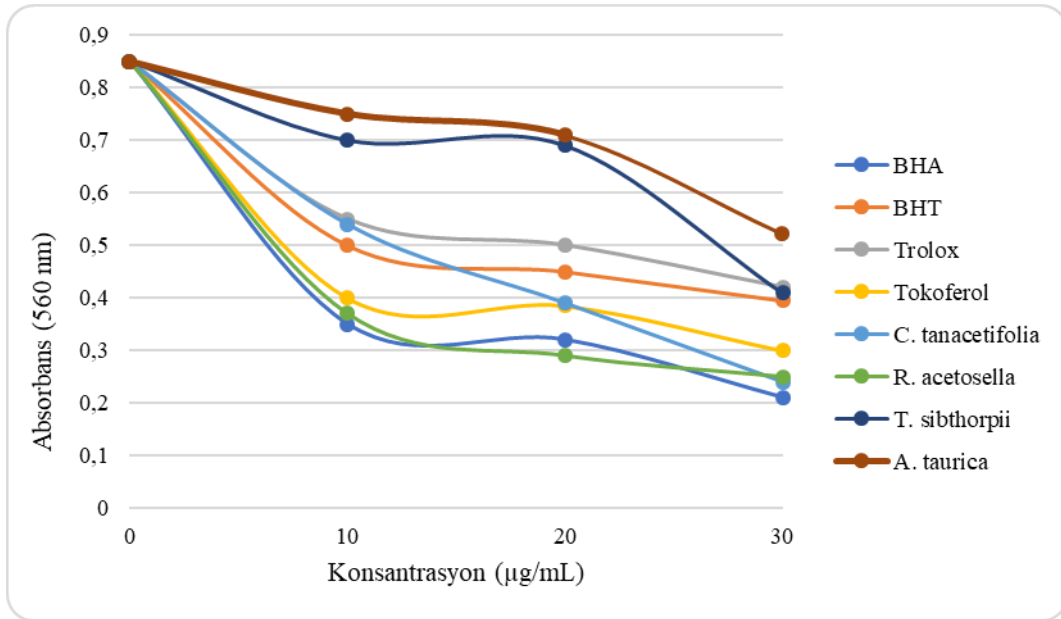
Şekil 5.72. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.8. Süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) giderme aktivitesi tayini

Çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak, ortamda bulunan süperoksit radikallerini giderme aktiviteleri belirlendi. Hazırlanan bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların, spektrofotometrede 560 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve çizilen Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.73 ve Şekil 5.74’de gösterildi.

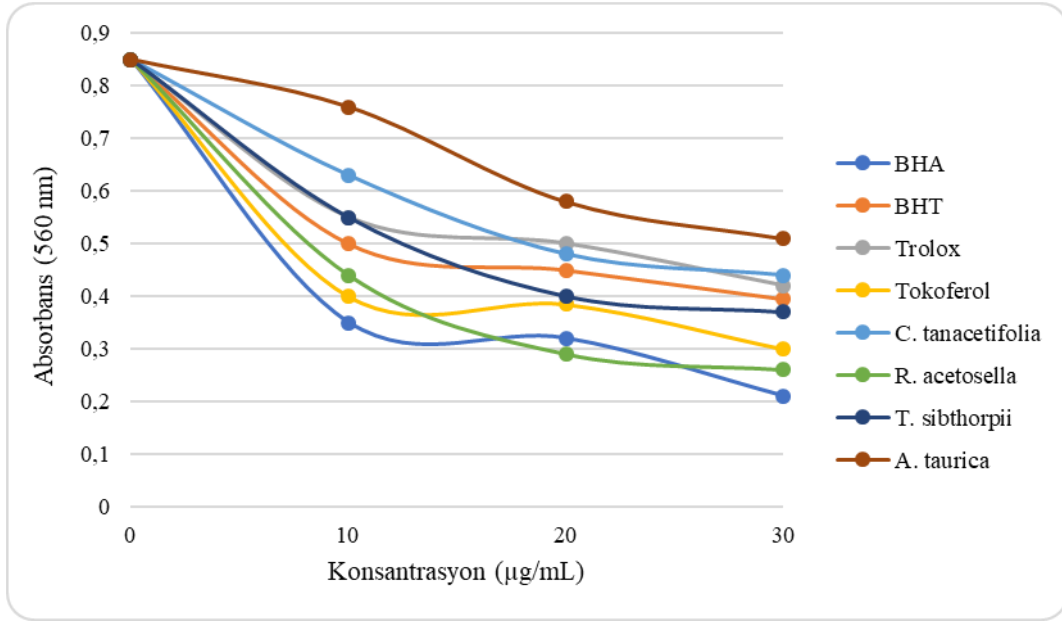
Ortamda bulunan süperoksit radikallerini giderme aktiviteleri yüzde (%) değer olarak aşağıda verilen denklemden yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{Süperoksit giderme aktivitesi (\%)} = \left[\frac{\lambda_{K560} - \lambda_{N560}}{\lambda_{K560}} \right] \times 100$$



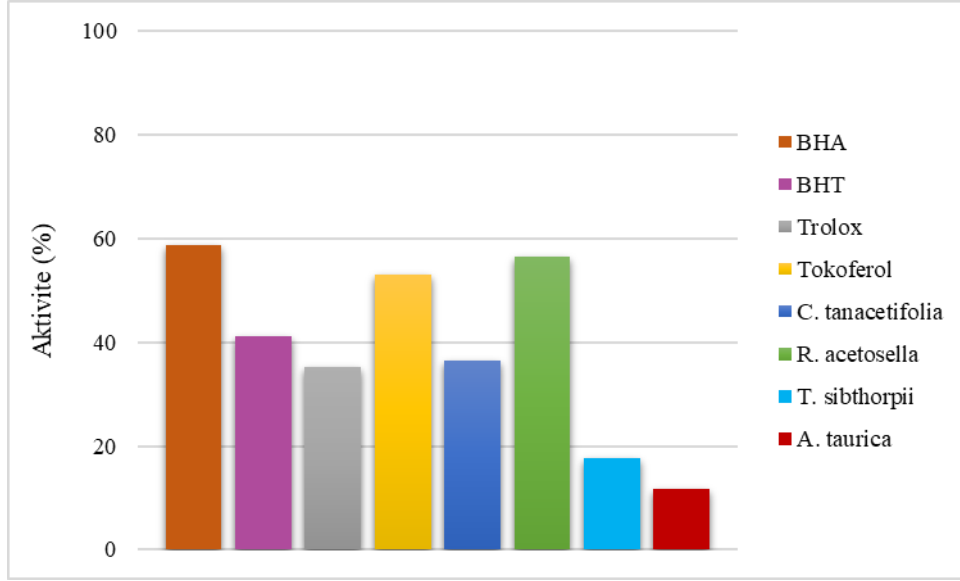
Şekil 5.73. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) sulu bitki ekstraktlarının süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.73’teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında süperoksit anyon radikali giderme kapasitesinin sulu bitki ekstraktlarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > R. acetosella > α-Tokoferol > BHT > C. tanacetifolia > Trolox > T. sibthorpii > A. taurica olduğu görülmüştür.

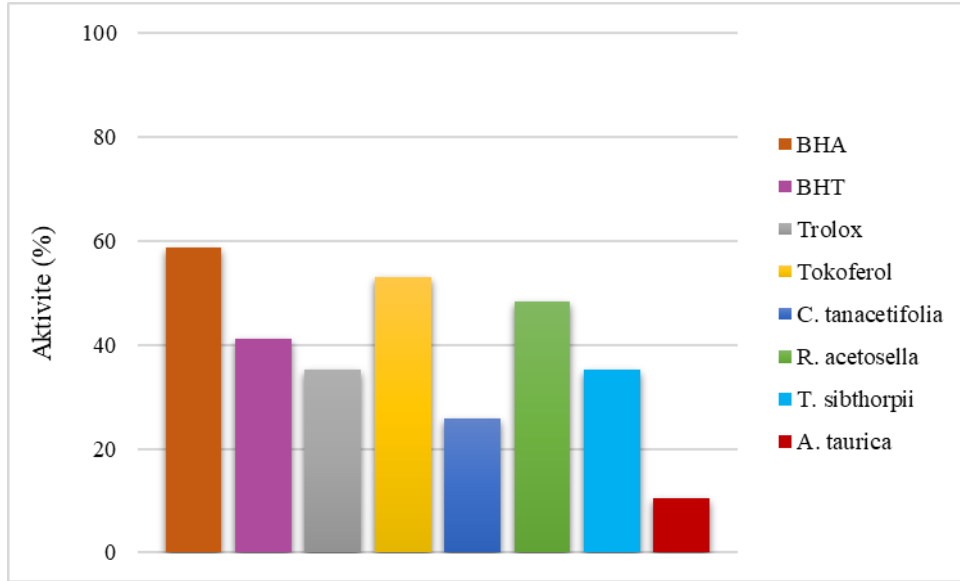


Şekil 5.74. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) etanollü bitki ekstralarının süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.74'teki absorbans değerleri karşılaştırıldığında süperoksit anyon radikali giderme kapasitesinin etanollü bitki ekstralarında 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHA > α -Tokoferol > R. acetosella > BHT > Trolox > T. sibthorpii > C. tanacetifolia > A. taurica olduğu görülmüştür.



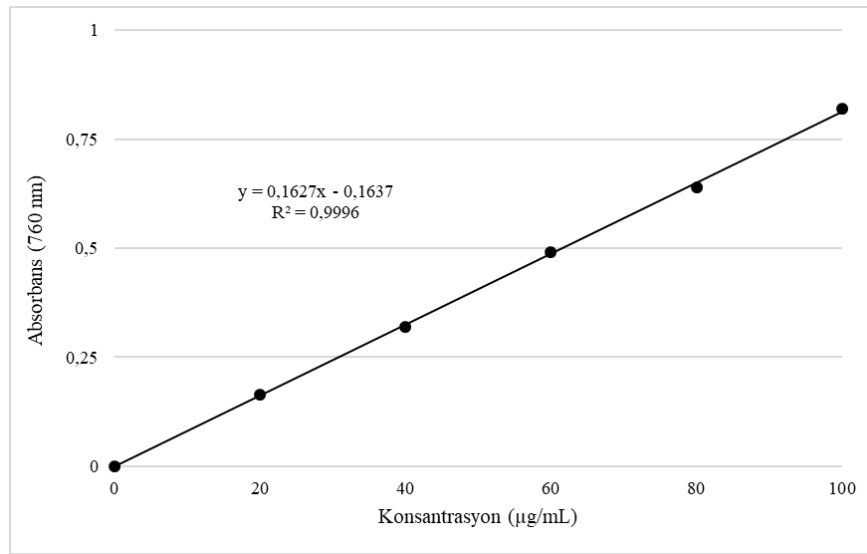
Şekil 5.75. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.76. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.9. Total fenolik bileşik miktar tayini

Total fenol miktarı tayininden önce ilk olarak gallik asit standart grafiği oluşturuldu (Şekil 5.77). Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak ve çalışmada kullanılan bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerinden farklı konsantrasyonlarda (10, 20 ve 30 µg/mL) alınarak fenol miktarları spektrofotometrik yöntemle, 760 nm’de ölçüm yapılarak belirlendi. Hazırlanan bitki ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları ölçülen absorbans değerleri ve gallik asit için çizilen standart grafikten yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 5.77. Gallik asit standart grafiği

Tablo 5.6. Bitki ekstrelerinin gallik asit’e eşdeğer total fenolik bileşik miktarları

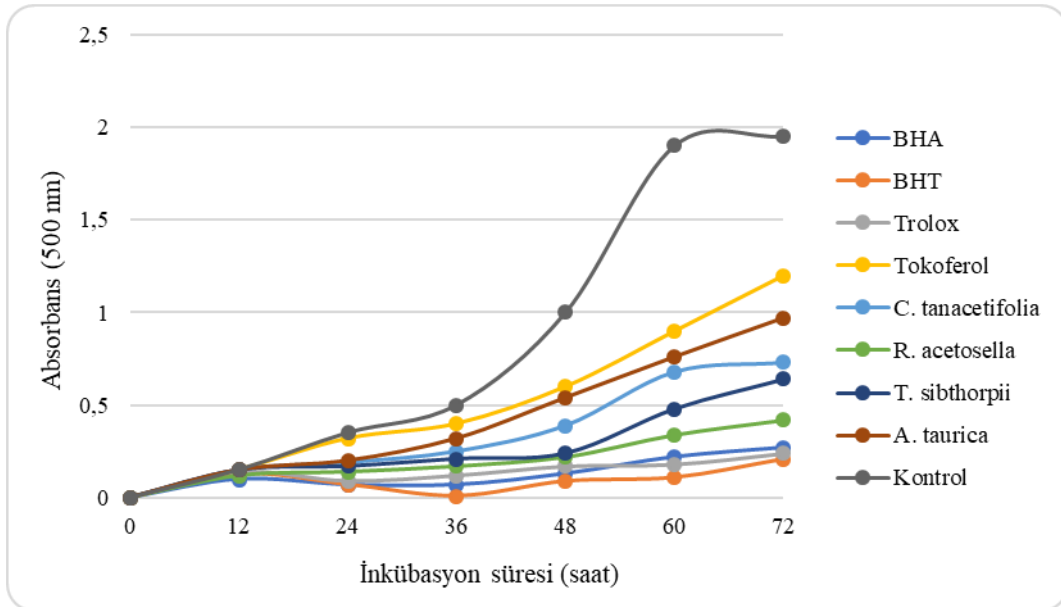
Bitkiler	Su ekstresinde bulunan	Etanol ekstresinde bulunan
	total fenolik bileşik (mgGAE/g ekstre)	total fenolik bileşik (mgGAE/g ekstre)
<i>C. tanacetifolia</i>	13,07	18,31
<i>R. acetosella</i>	16,10	19,10
<i>T. sibthorpii</i>	15,49	17,34
<i>A. taurica</i>	7,98	9,19

5.5.10. Total antioksidan aktivite tayini

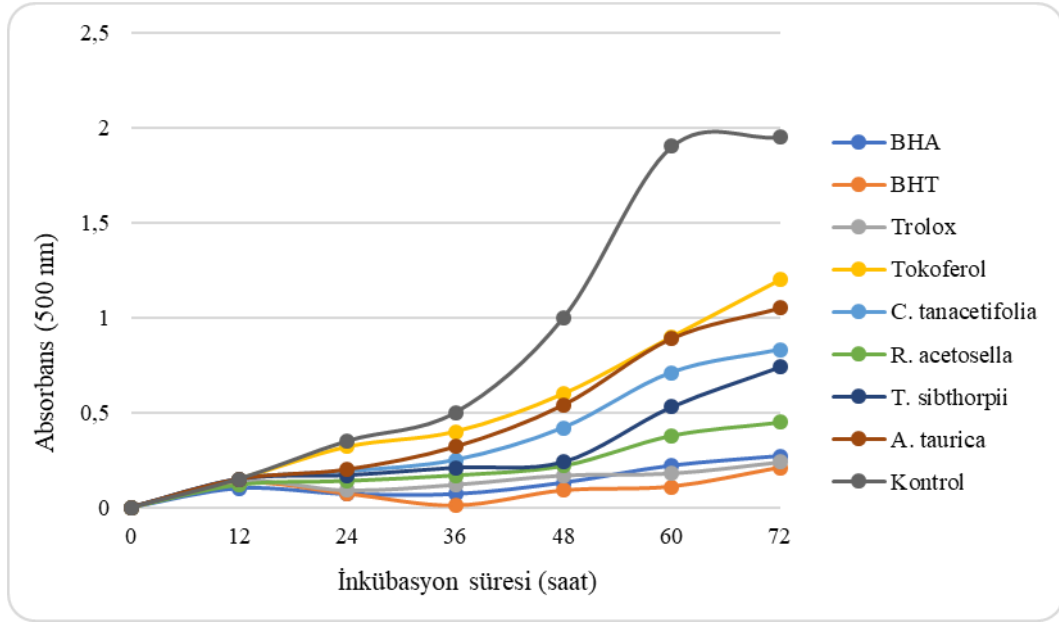
Hazırlanan bitki ekstralarının ve standart antioksidanların total antioksidan aktivite tayinleri tiyosiyanat metodu kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde önceden hazırlanan linoleik asit emülsiyonunun otooksidasyonunun sonucunda meydana gelen peroksitler, Fe^{3+} iyonlarını (ferröz), Fe^{2+} iyonlarına (ferrik) indirger ve bunun sonucunda oluşan Fe^{3+} iyonları (ferrik) tiyosiyanat ile (SCN^-) , $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ kompleksini oluşturur. Oluşan kompleksin spesifik olarak spektrofotometrede 500 nm’de absorbans vermesiyle ölçüm gerçekleştirildi ve total antioksidan aktivitesi belirlendi. Absorbans değerinin yüksek olması peroksidasyon sonucu oluşan peroksit radikallerinin miktarının fazla olduğunu ve kullanılan maddelerin antioksidan kapasitesinin düşük olduğunu gösterir.

Hazırlanan bitki ekstralarının ve standart antioksidanların total antioksidan aktivite yöntemiyle lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri yüzde (%) değer olarak aşağıda verilen denklemden yararlanılarak hesaplandı.

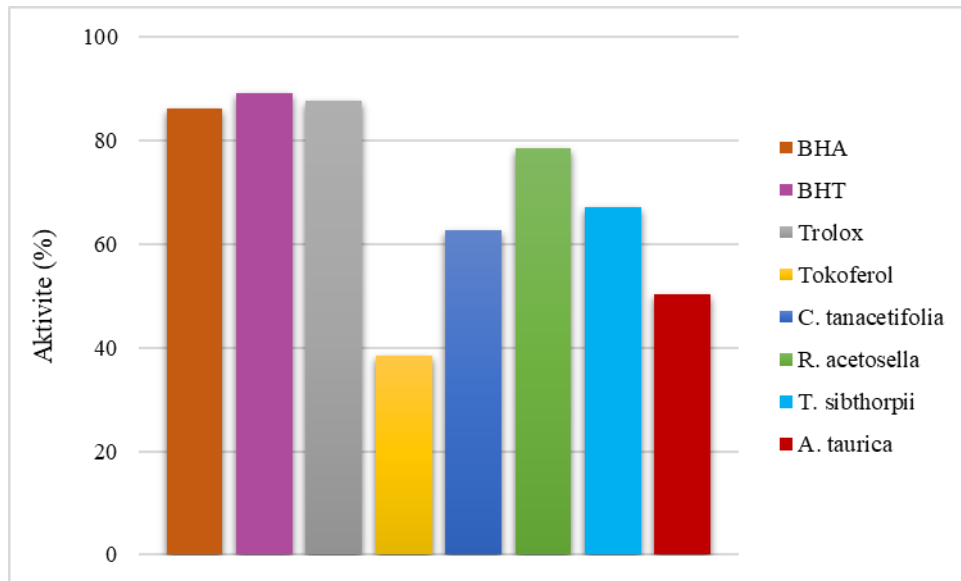
$$\text{Lipid peroksidasyonun inhibisyon yüzdesi (\%)} = \left[1 - \frac{\lambda_{N500}}{\lambda_{K500}} \right] \times 100$$



Şekil 5.78. 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

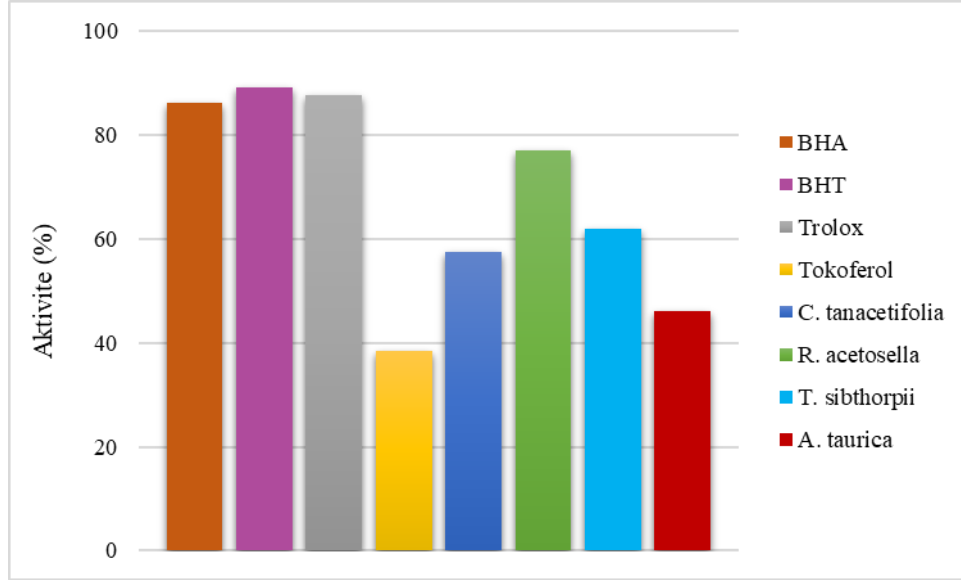


Şekil 5.79. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen sulu ekstrelerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması



Şekil 5.80. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan sulu ekstrelerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelерinin karşılaştırılması

Şekil 5.80’de sulu bitki ekstralarının ve standart antioksidanların total antioksidan aktivite yöntemiyle lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri karşılaştırıldığında 72. saatte ve 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHT > Trolox > BHA > *R. acetosella* > *T. sibthorpii* > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* > α-Tokoferol olduğu görülmüştür.



Şekil 5.81. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan etanollü ekstraların 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması

Şekil 5.81’de etanollü bitki ekstralarının ve standart antioksidanların total antioksidan aktivite yöntemiyle lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri karşılaştırıldığında 72. saatte ve 10 µg/mL konsantrasyon için sırasıyla BHT > Trolox > BHA > *R. acetosella* > *T. sibthorpii* > *C. tanacetifolia* > *A. taurica* > α-Tokoferol olduğu görülmüştür.

5.6. MTT Sitotoksosite Testi

MTT sitotoksosite testinin sonuçlarına göre *Crataegus tanacetifolia* ve *Rumex acetosella* bitkilerinin sulu ekstralarının IC₅₀ değerleri 500 µg/mL'nin üzerinde çıkarak diğer bütün ekstralara göre daha düşük miktarda toksik etki gösterdiği gözlemlendi.

Diğer taraftan *Asphodeline taurica* bitkisinin etanol ekstresinin IC₅₀ değeri 3,9 µg/mL'nin altında çıkarak diğer bütün ekstralara göre daha yüksek miktarda toksik etki gösterdiği gözlemlendi.

Tablo 5.7. MTT sonuçları

Bitkiler	Sulu ekstraların IC ₅₀ değeri (µg/mL)	Etanol ekstralarının IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
<i>Crataegus tanacetifolia</i>	>500	21,33±3,21
<i>Rumex acetosella</i>	>500	79±3,6
<i>Thymus sibthorpii</i>	88,33±4,04	460±36,05
<i>Asphodeline taurica</i>	191,66±10,4	<3,9

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

İnsan serumundan PON1 izoenziminin saflaştırma işlemine ilk olarak kısmi saflaştırma ile başlandı. Deneyler esnasında her seferinde 25 mL serum kullanılarak %60-80 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürme işleminden sonra elde ettiğimiz numune diyaliz edildi. Diyaliz işleminin ardından kalan 10 mL'lik enzim numunesi DEAE-Sephadex A-50 kolonundan geçirilerek elüatlar toplandı. Toplanan elüatları için 412 nm'de absorbans değerleri ölçülerek aktivite grafiği oluşturuldu (Şekil 5.33). Bu işlemin sonunda elde edilen toplam enzim numunesi bir sonraki işlem olan Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna düşük bir hızda tatbik edildi. Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonundan toplanan elüatlar için 280 nm ve 412 nm'de absorbans değerleri ölçülerek aktivite-absorbans grafiği oluşturuldu (Şekil 5.34).

Tablo 5.1'de görüldüğü üzere serumda, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi işlemlerinden sonra saflaştırma verileri hesaplandı. PON1 için yüzde (%) verim; amonyum sülfat çöktürmesi (diyaliz) sonrası %37,88, DEAE-Sephadex A-50 kolon kromatografisi sonrası %14,04 ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası %5,49 olarak hesaplandı. Spesifik aktiviteye bakıldığında; amonyum sülfat çöktürmesi (diyaliz) sonrası 32,99 EÜ/mg, DEAE-Sephadex A-50 kolon kromatografisi sonrası 400,9 EÜ/mg ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası 2612,22 EÜ/mg olarak bulundu.

Her aşamada elde ettiğimiz enzim numunesindeki protein miktarlarını ölçerken Bradford yöntemi kullanıldı. Bunun sonucunda protein miktarı sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi (diyaliz) sonrası 2,95 mg/mL, DEAE-Sephadex A-50 kolon kromatografisi sonrası 0,15 mg/mL ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kolon kromatografisi sonrası 0,018 mg/mL olarak hesaplandı. PON1 izoenziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı ve 43 kDA molekül kütlelerinde tek bant gözlemlendi.

Saflaştırdığımız PON1 izoenziminin aktivitesi üzerine bazı bitki ekstraktlarının etkileri incelendi. 25-125 µg/mL arasındaki 5 farklı konsantrasyon kullanılarak %Aktivite değerleri belirlendi. Sonuçlar karşılaştırıldığında PON1 için *Rumex acetosella* bitkisinin etanollü ekstresi en yüksek %Aktivite değerini verirken, *Asphodeline taurica* bitkisinin sulu ekstresi en düşük %Aktivite değerini gösterdi.

LC/MS-IT-TOF cihazı yardımı ile deneysel çalışmalarda kullandığımız 4 farklı bitkinin sulu ve etanollü ekstraktlarında bulunan başlıca etken maddeler belirlendi ve

moleköl yapıları çizildi. Belirlenen bu maddelerle PON1 izoenziminin aktif bölgesinde moleküler docking çalışmaları uygulandı. Bu çalışmalara göre;

PON1 için *Crataegus tanacetifolia* bitkisinin sulu ekstresinde tespit edilen 6-metoksi apigenin, kateşin ve maslinik asit aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile tuz köprüsü kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Asp221, Glu239, Gly199, Gln20, Ser23 ve Leu200 aminoasitleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Aynı bitkinin etanollü ekstresinde tespit edilen hiperozid ve kuersetin aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Kuinik asit ise aktif bölgede bulunmayarak etkileşim göstermemiştir. Hiperozid ve kuersetin enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile tuz köprüsü kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Asp221, Gly199 ve Lys244 aminoasitleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur.

PON1 için *Rumex acetosella* bitkisinin sulu ekstresinde tespit edilen ferulik asit ve kurkumin aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Alfa-ketoglutarik asit ise aktif bölgede bulunmayarak etkileşim göstermemiştir. Ferulik asit ve kurkumin enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile tuz köprüsü ve metak bağı kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Asp221, Glu239, Lys244, Leu198, Ser23 ve Trp202 aminoasitleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur. Aynı bitkinin etanollü ekstresinde tespit edilen kurkumin, kafeik asit-3-glukozid ve orientin aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Kurkumin, kafeik asit-3-glukozid ve orientin enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile tuz köprüsü kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Glu239, Gly199, Gln20, Lys244, Leu198, Leu200, Ser23 ve Trp202 aminoasitleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur.

PON1 için *Thymus sibthorpii* bitkisinin sulu ekstresinde tespit edilen ekonazol, prepenik asit ve kafeik asit etil ester aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile etkileşmemiştir. Bu bileşikler His243, Gly199, Glu239, Lys244, Ser23 ve Trp202 aminoasitleri ile hidrojen bağı ve π - π etkileşimi kurmuştur. Aynı bitkinin etanollü ekstresinde tespit edilen eriodiktiol-7-glukuronid ve luteolin-7-glukozid aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Sitrik asit ise aktif bölgede bulunmayarak etkileşim göstermemiştir. Eriodiktiol-7-glukuronid ve luteolin-7-glukozid enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile metal bağı kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Asp221, Glu239, Gly219, Leu198 ve Ser23 aminoasitleri ile hidrojen bağı oluşturmuştur.

PON1 için *Asphodeline taurica* bitkisinin sulu ekstresinde tespit edilen ekonazol ve metil kafeik asit aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Geraniloksiemodin ise aktif bölgede bulunmasına rağmen kalsiyum metali (Ca1363) ve aminoasitler ile etkileşmemiştir. Ekonazol ve metil kafeik asit enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile tuz köprüsü ve metal bağı kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler His243, Lys244 ve Gly219 aminoasitleri ile hidrojen bağı ve π - π etkileşimi oluşturmuştur. Aynı bitkinin etanollü ekstresinde tespit edilen kafeik asit-3-sülfat, p-kumarik asit ve 1-hidroksi-8-metoksi-2-antrakinon aktif bölgede kuvvetli afinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde yer alan kalsiyum metali (Ca1363) ile metal bağı ve tuz köprüsü kurmuştur. Aynı zamanda bu bileşikler Ala242, Asp221 ve Lys244 aminoasitleri ile tuz köprüsü ve hidrojen bağları oluşturmuştur.

Demir indirgeme kuvveti tayini, FRAP metodu, CUPRAC metodu, ABTS radikali giderme aktivitesi tayini, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini, DMPD radikali giderme aktivitesi tayini, bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini, süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini, total fenolik bileşik miktar tayini ve total antioksidan aktivite tayini testleri yapılarak hazırlanan sulu ve etanollü bitki ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri belirlendi. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, Trolox, α -Tokoferolün stok çözeltilerinden ve bitki ekstraktlarından belirli konsantrasyonlarda alınarak gerekli prosedürler uygulandıktan sonra yapılan absorbans ölçümleri kıyaslanarak antioksidan etkileri grafik şeklinde ve sıralama olarak verildi.

Demir indirgeme kuvveti tayini sonuçlarına bakıldığında *Thymus sibthorpii* ve *Rumex acetosella*'nın ekstraktlarının Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirgeme kapasitelerinin Trolox ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

FRAP metodu sonuçlarına bakıldığında *Thymus sibthorpii* ve *Rumex acetosella*'nın ekstraktlarının Fe^{3+} (ferrik) iyonlarını Fe^{2+} (ferröz) iyonlarına indirgeme kapasitelerinin α -Tokoferol standart antioksidanına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

CUPRAC metodu sonuçlarına bakıldığında *Crataegus tanacetifolia*, *Rumex acetosella*, *Asphodeline taurica* ve *Thymus sibthorpii*'nin ekstraktlarının Cu^{2+} iyonlarını Cu^{+} iyonlarına indirgeme kapasitelerinin Trolox ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

ABTS radikali giderme aktivitesi tayini sonuçlarına bakıldığında *Crataegus tanacetifolia*, *Rumex acetosella* ve *Thymus sibthorpii*'nin ekstraktlarının ABTS radikali

giderme kapasitelerinin BHT, Trolox ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini sonuçlarına bakıldığında *Rumex acetosella* ve *Thymus sibthorpii*'nin ekstrelerinin DPPH radikali giderme kapasitelerinin Trolox ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

DMPD radikali giderme aktivitesi tayini sonuçlarına bakıldığında *Rumex acetosella*'nın ekstrelerinin DMPD serbest radikali giderme kapasitesinin BHA, BHT ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini sonuçlarına bakıldığında *Rumex acetosella* ve *Crataegus tanacetifolia*'nin ekstrelerinin metal şelatlama kapasitelerinin BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini sonuçlarına bakıldığında *Rumex acetosella*'nın ekstrelerinin süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinin BHT ve Trolox standart antioksidanlarına kıyasla daha yüksek olduğu bulundu.

Tablo 5.6'da görüldüğü üzere bitkilerin sulu ve etanollü ekstreleri kıyaslandığında *Rumex acetosella*'nın hem sulu hem de etanollü ekstresinin en yüksek total fenolik bileşik miktarına sahip olduğu tespit edildi. *Asphodeline taurica*'nın ise sulu ve etanollü ekstresinin en düşük total fenolik bileşik miktarına sahip olduğu bulundu.

Total antioksidan aktivite tayini ile lipid peroksitlerini inhibe etme kapasitelerine bakıldığında 72. saatte ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon için tüm bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerinin α -Tokoferol standart antioksidanına kıyasla daha yüksek; BHA, BHT ve Trolox standart antioksidanlarına kıyasla ise daha düşük olduğu bulundu.

Tez çalışmasında kullanılan 4 farklı bitkinin MTT sitotoksikite testinin sonuçlarına bakıldığında *Crataegus tanacetifolia* ve *Rumex acetosella* bitkilerinin sulu ekstrelerinin IC_{50} değerleri 500 $\mu\text{g/mL}$ 'nin üzerinde çıkarak diğer bütün ekstrelerle göre daha düşük miktarda toksik etki gösterdiği, *Asphodeline taurica* bitkisinin etanol ekstresinin IC_{50} değeri 3,9 $\mu\text{g/mL}$ 'nin altında çıkarak diğer bütün ekstrelerle göre daha yüksek miktarda toksik etki gösterdiği gözlemlendi. Diğer ekstrelerin IC_{50} değerleri ise 3,9 ile 500 $\mu\text{g/mL}$ aralığında değişkenlik gösterdi (Tablo 5.7).

Tablo 6.1. *PON1* izoenziminin saflaştırılmasının ve aktivite çalışmalarının toplu verileri

PON1 izoenziminin saflaştırılması ile ilgili toplu veriler			
	Amonyum sülfat çöktürmesi (Diyaliz)	DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim	Sephadex G-100 jel filtrasyon
Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	32,99	400,90	2612,22
Saflaştırma Katsayısı	1,004	12,21	79,54
Verim (%)	37,88	14,04	5,49
PON1 izoenziminin molekül kütlesi tayini			
SDS-PAGE			43 kDa
PON1 izoenzimi ile ilgili aktivite çalışmaları			
Bitkiler	Sulu Ekstre Aktivite (%)	Etanollü Ekstre Aktivite (%)	
<i>Crataegus tanacetifolia</i>	115	127	
<i>Rumex acetosella</i>	126	148	
<i>Thymus sibthorpii</i>	121	137	
<i>Asphodeline taurica</i>	104	110	

Tablo 6.2. *PON1* izoenziminin docking çalışmaları için toplu veriler

PON1 izoenziminin docking çalışmaları için toplu veriler			
Bitki ekstresi	Tespit edilen etken maddeler	Aktif bölgede bağlandığı amino asit	Bağ türü
<i>C. tanacetifolia</i> sulu ekstre	Maslinik asit, kateşin, 6-metoksi apigenin	Asp221, Glu239, Gly199, Gln20, Ser23 ve Leu200	Hidrojen bağları
<i>C. tanacetifolia</i> etanollü ekstre	Hiperozid, kuersetin	Asp221, Gly199 ve Lys244	Hidrojen bağları
<i>R. acetosella</i> sulu ekstre	Ferulik asit, kurkumin	Asp221, Glu239, Leu198, Lys244, Ser23 ve Trp202	Hidrojen bağları
<i>R. acetosella</i> etanollü ekstre	Orientin, kafeik asit-3-glukozid, kurkumin	Glu239, Gly199, Gln20, Leu198, Leu200, Lys244, Ser23 ve Trp202	Hidrojen bağları
<i>T. sibthorpii</i> sulu ekstre	Kafeik asit etil ester, ekonazol, prephenik asit	His243, Glu239, Gly199, Lys244, Ser23 ve Trp202	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
<i>T. sibthorpii</i> etanollü ekstre	Eriodiktiol-7-O-glukuronid, luteolin-7-glukozid	Asp221, Glu239, Gly219, Leu198 ve Ser23	Hidrojen bağları
<i>A. taurica</i> sulu ekstre	Metil kafeik asit, ekonazol, geraniloksiemodin	His234, Gly219 ve Lys244	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
<i>A. taurica</i> etanollü ekstre	Kafeik asit-3-sülfat, <i>p</i> -kumarik asit, 1-hidroksi-8-metoksi-2-metil-antrokinon	Asp221, Ala242 ve Lys244	Tuz köprüsü ve hidrojen bağları

Tablo 6.3. Antioksidan deneylerinin toplu verileri

Antioksidan deneylerinin toplu verileri		
Deneyin Adı	Bitki ekstraktlarının ve standart antioksidanların 10 µg/mL konsantrasyonları için aktivite sıralamaları	
	Sulu ekstraktlar	Etanollü ekstraktlar
Demir indirgeme kuvveti tayini (Fe ³⁺ - Fe ²⁺)	BHA > BHT > <i>T. sibthorpii</i> > α-Tokoferol > Trolox > <i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i>	BHA > BHT > <i>R. acetosella</i> > α-Tokoferol > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > Trolox > <i>A. taurica</i>
FRAP metodu	BHA > Trolox > BHT > <i>T. sibthorpii</i> > α-Tokoferol > <i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i>	BHA > Trolox > BHT > <i>R. acetosella</i> > <i>T. sibthorpii</i> > α-Tokoferol > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i>
CUPRAC metodu	BHA > BHT > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>R. acetosella</i> > <i>A. taurica</i> > <i>T. sibthorpii</i> > Trolox > α-Tokoferol	BHA > BHT > <i>A. taurica</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>R. acetosella</i> > <i>T. sibthorpii</i> > Trolox > α-Tokoferol
ABTS radikali giderme aktivitesi tayini	BHA > <i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>T. sibthorpii</i> > α-Tokoferol > <i>A. taurica</i> > Trolox > BHT	BHA > <i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>T. sibthorpii</i> > <i>A. taurica</i> > α-Tokoferol > Trolox > BHT
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini	BHA > BHT > <i>T. sibthorpii</i> > <i>R. acetosella</i> > Trolox > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i> > α-Tokoferol	<i>R. acetosella</i> > BHA > BHT > <i>C. tanacetifolia</i> > Trolox > <i>T. sibthorpii</i> > α-Tokoferol > <i>A. taurica</i>
DMPD radikali giderme aktivitesi tayini	<i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > Trolox > <i>T. sibthorpii</i> > BHT > <i>A. taurica</i> > α-Tokoferol > BHA	Trolox > <i>R. acetosella</i> > BHT > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i> > α-Tokoferol > BHA
Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	<i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > α-Tokoferol > <i>A. taurica</i> > <i>T. sibthorpii</i> > Trolox > BHT > BHA	<i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > α-Tokoferol > <i>A. taurica</i> > <i>T. sibthorpii</i> > Trolox > BHT > BHA
Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini	BHA > <i>R. acetosella</i> > α-Tokoferol > BHT > <i>C. tanacetifolia</i> > Trolox > <i>T. sibthorpii</i> > <i>A. taurica</i>	BHA > α-Tokoferol > <i>R. acetosella</i> > BHT > Trolox > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i>
Total fenol miktarı tayini	<i>R. acetosella</i> > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i>	<i>R. acetosella</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>T. sibthorpii</i> > <i>A. taurica</i>
Total antioksidan aktivite tayini	BHT > Trolox > BHA > <i>R. acetosella</i> > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i> > α-Tokoferol	BHT > Trolox > BHA > <i>R. acetosella</i> > <i>T. sibthorpii</i> > <i>C. tanacetifolia</i> > <i>A. taurica</i> > α-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] Ferrier, D.R. (2014). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Sixth edition ed. New York.
- [4] Moore, J.T., Langley, R.H. (2010). *Biochemistry for dummies*. Indianapolis, India: John Wiley & Sons.
- [5] Tipton, K., Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16 (1), 34-40.
- [6] Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspect Sci*, 1 (1-6), 74-87.
- [7] Li, H.-L., Liu, D.-P., Liang, C.-C. (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med*, 81 (12), 766-779.
- [8] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (2002). The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 13 (4), 357-362.
- [9] MACKNESS, B., DURRINGTON, P.N., ABUASHIA, B., BOULTON, A.J., MACKNESS, M.I. (2000). Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci*, 98 (3), 355-363.
- [10] Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., La Du, B.N. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is an HDL-associated lactonase and protects LDL against oxidation. *J Biol Chem*,
- [11] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (1998). Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol-Vasc S*, 31 (3), 329-336.
- [12] Androutsopoulos, V.P., Kanavouras, K., Tsatsakis, A.M. (2011). Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharm*, 256 (3), 418-424.
- [13] Ng, C.J., Shih, D.M., Hama, S.Y., Villa, N., Navab, M., Reddy, S.T. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Bio Med*, 38 (2), 153-163.

- [14] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 19 (1), 100-106.
- [15] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E. (1991). Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry-U.S.*, 30 (42), 10141-10149.
- [16] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B., McCarthy, A., Toker, L. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 11 (5), 412.
- [17] Jawad, Z., Paoli, M. (2002). Novel sequences propel familiar folds. *Struct*, 10 (4), 447-454.
- [18] Vitarius, J.A., Sultatos, L.G. (1994). The role of calcium in the hydrolysis of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase. *Life Sci*, 56 (2), 125-134.
- [19] Eckerson, H., Swendris, R., Smolen, A., La Du, B. (1982). A quantitative analysis of the calcium requirements of human serum paraoxonase/arylesterase. *Pharmacologist*, 24, 232.
- [20] Kuo, C.-L., La Du, B.N. (1998). Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases: structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos*, 26 (7), 653-660.
- [21] Draganov, D., La Du, B.N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *N-S Arch Pharmacol*, 369 (1), 78-88.
- [22] Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordan-Starck, T.C., Harmony, J.A. (1994). Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry-U.S.*, 33 (3), 832-839.
- [23] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.-L., Adkins, S., Lockridge, O., La Du, B.N. (1995). Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *P Natl A Sci*, 92 (16), 7187-7191.
- [24] La Du, B.N. (2003): Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease. Am Heart Assoc.
- [25] Schmidt, H., Schmidt, R., Niederkorn, K., Gradert, A., Schumacher, M., Watzinger, N., Hartung, H.-P., Kostner, G.M. (1998). Paraoxonase PON1 polymorphism leu-

- Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian stroke prevention study. *Stroke*, 29 (10), 2043-2048.
- [26] La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C., Standiford, T.J. (1999). On the physiological role (s) of the paraoxonases. *Chemico-biological interactions*, 119, 379-388.
- [27] Cherki, M., Berrougui, H., Isabelle, M., Cloutier, M., Koumbadinga, G.A., Khalil, A. (2007). Effect of PON1 polymorphism on HDL antioxidant potential is blunted with aging. *Exp Gerontol*, 42 (8), 815-824.
- [28] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (1999). Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet*, 353 (9151), 468-469.
- [29] Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*, 3 (1), 73.
- [30] Gaidukov, L., Rosenblat, M., Aviram, M., Tawfik, D.S. (2006). The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 47 (11), 2492-2502.
- [31] Arpacı, A., GÖRMÜŞ, U., Dalan, B., Berkman, S., Isbir, T. (2009). Investigation of PON1 192 and PON1 55 polymorphisms in ovarian cancer patients in Turkish population. *In Vivo*, 23 (3), 421-424.
- [32] Nielsen, S.S., Mueller, B.A., De Roos, A.J., A. Viernes, H.-M., Farin, F.M., Checkoway, H. (2005). Risk of brain tumors in children and susceptibility to organophosphorus insecticides: the potential role of paraoxonase (PON1). *Environ Health Persp*, 113 (7), 909-913.
- [33] Lee, C.H., Lee, K.Y., Choe, K.H., Hong, Y.C., Kim, Y.D., Kang, J.W., Kim, H. (2005). Effects of oxidative DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and genetic polymorphism of the paraoxonase-1 (PON1) gene on lung cancer. *J Prev Med Pub Heal*, 38 (3), 345-350.
- [34] Saadat, M. (2012). Paraoxonase 1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol*, 36 (2), 101-103.
- [35] La Du, B. (1992). Human serum paraoxonase/arylesterase. *Pharmaco Drug Meth*, 51-91.

- [36] Brealey, C.J., Walker, C.H., Baldwin, B.C. (1980). A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic Sci*, 11 (5), 546-554.
- [37] Li, W.F., Furlong, C.E., Costa, L.G. (1995). Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett*, 76 (3), 219-226.
- [38] Harel, M., Brumshtein, B., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. (2007). 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arch Indhyg Tox*, 58 (3), 347-353.
- [39] Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B.N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*, 46 (6), 1239-1247.
- [40] Josse, D., Lockridge, O., Xie, W., Bartels, C.F., Schopfer, L.M., Masson, P. (2001). The active site of human paraoxonase (PON1). *J Appl Tox*, 21 (S1), S7-S11.
- [41] Hu, X., Jiang, X., Lenz, D.E., Cerasoli, D.M., Wallqvist, A. (2009). In silico analyses of substrate interactions with human serum paraoxonase 1. *Proteins*, 75 (2), 486-498.
- [42] Khersonsky, O., Tawfik, D.S. (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem*, 281 (11), 7649-7656.
- [43] Aviram, M., Rosenblat, M. (2008). Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases, in *Advanced Protocols in Oxidative Stress I* (s. 259-276). Springer.
- [44] Costa, L.G. (2017). Organophosphorus compounds at 80: some old and new issues. *Toxicol Sci*, 162 (1), 24-35.
- [45] Costa, L.G., Cole, T.B., Vitalone, A., Furlong, C.E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta*, 352 (1-2), 37-47.
- [46] Klaassen, C.D., Amdur, M.O. (2013). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. McGraw-Hill New York.
- [47] Androutsopoulos, V.P., Hernandez, A.F., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M. (2013). A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 307, 89-94.

- [48] Tsiaoussis, J., Hatzidaki, E., Docea, A., Nikolouzakis, T., Petrakis, D., Burykina, T., Mamoulakis, C., Makrigiannakis, A., Tsatsakis, A. (2018). Molecular and clinical aspects of embryotoxicity induced by acetylcholinesterase inhibitors. *Toxicology*, 409, 137-143.
- [49] Aldridge, W. (1953). Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*, 53 (1), 110.
- [50] Chambers, J.E. (2008). PON1 multitasks to protect health. *P Natl A Sci*, 105 (35), 12639-12640.
- [51] Richter, R.J., Jarvik, G.P., Furlong, C.E. (2008). Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circulation: Genom Prec Med*, 1 (2), 147-152.
- [52] Valiyaveetil, M., Alamneh, Y., Biggemann, L., Soojhawon, I., Doctor, B.P., Nambiar, M.P. (2010). Efficient hydrolysis of the chemical warfare nerve agent tabun by recombinant and purified human and rabbit serum paraoxonase 1. *Biochem Bioph Res Co*, 403 (1), 97-102.
- [53] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N. (2003). Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem Pharmacol*, 66 (6), 887-896.
- [54] Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La Du, B. (2000). Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos*, 28 (11), 1335-1342.
- [55] Jakubowski, H. (2000). Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase a protective mechanism against protein-homocysteinylation. *J Biol Chem*, 275 (6), 3957-3962.
- [56] Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y., Morino, A. (1998). Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos*, 26 (4), 355-359.
- [57] Kearney, A.S., Crawford, L.F., Mehta, S.C., Radebaugh, G.W. (1993). The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. *Pharm Res*, 10 (10), 1461-1465.

- [58] Durrington, P., Mackness, B., Mackness, M. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 21 (4), 473-480.
- [59] Costa, L.G., Furlong, C.E. (2002). *Paraoxonase (PON1) in health and disease: basic and clinical aspects*. Springer Science & Business Media.
- [60] Lock, E.A., Reed, C.J. (1998). Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney. *Toxicol Pathol*, 26 (1), 18-25.
- [61] La Du, B.N., Novais, J. (1989). Human serum organophosphatase: biochemical characteristics and polymorphic inheritance. *Enzyme Hydro Organophosphorus Compd*, 41-52.
- [62] Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N. (1991). Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *Febs Lett*, 286 (1-2), 152-154.
- [63] James, R.W., Deakin, S.P. (2004). The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radical Bio Med*, 37 (12), 1986-1994.
- [64] Rosenblat, M., Vaya, J., Shih, D., Aviram, M. (2005). Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 179 (1), 69-77.
- [65] Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.-R., Navab, M., Li, W.-F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394 (6690), 284.
- [66] Rodrigo, L., Hernández, A.F., Lopez-Caballero, J.J., Gil, F., Pla, A. (2001). Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chemico-biological interactions*, 137 (2), 123-137.
- [67] Yuknavage, K.L., Fenske, R.A., Kalman, D.A., Keifer, M.C., Furlong, C.E. (1997). Simulated dermal contamination with capillary samples and field cholinesterase biomonitoring. *J Tox Env Health*, 51 (1), 35-55.
- [68] Martínez Vidal, J.L., Egea González, F., Martínez Galera, M., Castro Cano, M. (1998). Diminution of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon in tomatoes and green beans grown in greenhouses. *J Agr Food Chem*, 46 (4), 1440-1444.

- [69] Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop Jr, T., Khalil, A. (2004). Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*, 39 (1), 59-66.
- [70] Dardiotis, E., Aloizou, A.-M., Siokas, V., Tsouris, Z., Rikos, D., Marogianni, C., Aschner, M., Kovatsi, L., Bogdanos, D.P., Tsatsakis, A. (2019). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms in organophosphate metabolism. *Toxicology*, 411, 24-31.
- [71] Mackness, M.I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P.H., Arrol, S., Ishola, M., Durrington, P.N. (1991). Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 86 (2-3), 193-199.
- [72] Goldstein, L., Brown, S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 46 (1), 897-930.
- [73] McElveen, J., Mackness, M., Colley, C., Peard, T., Warner, S., Walker, C. (1986). Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 32 (4), 671-673.
- [74] Szabó, F., Rona, K., Czinner, A., Gachalyi, B., Kaldor, A. (1987). Is paraoxon hydrolytic activity in serum predictive of myocardial infarction? *Clin Chem*, 33 (5), 742-743.
- [75] Abbott, C.A., Mackness, M.I., Kumar, S., Boulton, A.J., Durrington, P.N. (1995). Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 15 (11), 1812-1818.
- [76] Camps, J., Cabr, M., Paul, A., Joven, J. (2001). Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 50 (9), 997-1000.
- [77] Jarvik, G.P., Tsai, N.T., McKinsty, L.A., Wani, R., Brophy, V.H., Richter, R.J., Schellenberg, G.D., Heagerty, P.J., Hatsukami, T.S., Furlong, C.E. (2002). Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 22 (8), 1329-1333.
- [78] James, R.W., Leviev, I., Righetti, A. (2000). Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 101 (19), 2252-2257.

- [79] Rao, M.N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D.A., Seeff, L.B., Strader, D.B., Lakshman, M.R. (2003). Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolis*, 52 (10), 1287-1294.
- [80] Aviram, M., Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Bio Med*, 37 (9), 1304-1316.
- [81] Maggi, P., Serio, G., Epifani, G., Fiorentino, G., Saracino, A., Fico, C., Perilli, F., Lillo, A., Ferraro, S., Gargiulo, M. (2000). Premature lesions of the carotid vessels in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors. *Aids*, 14 (16), F123-F128.
- [82] Bacchetti, T., Ferretti, G., Sahebkar, A. (2017): The role of paraoxonase in cancer. *Seminars in cancer biology*. Elsevier.
- [83] Abraham, P., Sugumar, E. (2008). Enhanced PON1 activity in the kidneys of cyclophosphamide treated rats may play a protective role as an antioxidant against cyclophosphamide induced oxidative stress. *Arch Tox*, 82 (4), 237-238.
- [84] Alim, Z., Beydemir, Ş. (2016). Some anticancer agents act on human serum paraoxonase-1 to reduce its activity. *Chem Biol Drug Des*, 88 (2), 188-196.
- [85] Mackness, M., Durrington, P., Mackness, B. (2004). Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 15 (4), 399-404.
- [86] Maritim, A., Sanders, a., Watkins Iii, J. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Tox*, 17 (1), 24-38.
- [87] Baum, L., Ng, H.K., Woo, K.S., Tomlinson, B., Rainer, T.H., Chen, X., Cheung, W.S., Chan, D.K.Y., Thomas, G.N., Tong, C.S.W. (2006). Paraoxonase 1 gene Q192R polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. *Clin Biochem*, 39 (3), 191-195.
- [88] Goswami, B., Tayal, D., Gupta, N., Mallika, V. (2009). Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta*, 410 (1-2), 1-12.
- [89] Deakin, S.P., James, R.W. (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*, 107 (5), 435-447.

- [90] Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101 (21), 2510-2517.
- [91] Cao, H., Girard-Globa, A., Berthezene, F., Moulin, P. (1999). Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q→R genetic polymorphism. *J Lipid Res*, 40 (1), 133-139.
- [92] Camps, J., García-Heredia, A., Hernández-Aguilera, A., Joven, J. (2016). Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable diseases. *Chemico-biological interactions*, 259, 382-387.
- [93] Cellini, E., Tedde, A., Bagnoli, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Bessi, V., Bracco, L., Sorbi, S. (2006). Association analysis of the paraoxonase-1 gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Let*, 408 (3), 199-202.
- [94] Paşca, S.P., Nemeş, B., Vlase, L., Gagyí, C.E., Dronca, E., Miu, A.C., Dronca, M. (2006). High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life Sci*, 78 (19), 2244-2248.
- [95] Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T. (2001). Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 276 (48)
- [96] Giordano, G., Cole, T.B., Furlong, C.E., Costa, L.G. (2011). Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: a neuroprotective role? *Toxicol Appl Pharm*, 256 (3), 369-378.
- [97] Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltrán, R., Joven, J., Camps, J. (2008). Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radical Bio Med*, 45 (2), 146-157.
- [98] Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusis, A.J., Navab, M., Fogelman, A.M. (2001). Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*, 21 (4), 542-547.

- [99] Hegele, R.A. (1999). Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*, 31 (3), 217-224.
- [100] Campo, S., Sardo, A.M., Campo, G.M., Avenoso, A., Castaldo, M., D'Ascola, A., Giunta, E., Calatroni, A., Saitta, A. (2004). Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res-Fund Mol M*, 546 (1), 75-80.
- [101] Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev*, 2014
- [102] Wojtunik-Kulesza, K.A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomed Pharm*, 78, 39-49.
- [103] Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
- [104] Turpaev, K. (2002). Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry-Moscow*, 67 (3), 281-292.
- [105] Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 3 (1), 91-100.
- [106] Genestra, M. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, 19 (9), 1807-1819.
- [107] Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88 (4), 1243-1276.
- [108] Halliwell, B. (1995): How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem soc symp.* pp. 73-101.
- [109] Carmona-Gutierrez, D., Alavian-Ghavanini, A., Habernig, L., Bauer, M., Hammer, A., Rossmann, C., Zimmermann, A., Ruckenstein, C., Büttner, S., Eisenberg, T. (2013). The cell death protease Kex1p is essential for hypochlorite-induced apoptosis in yeast. *Cell Cycle*, 12 (11), 1704-1712.
- [110] Wagner, K.-H., Reichhold, S., Hölzl, C., Knasmüller, S., Nics, L., Meisel, M., Neubauer, O. (2010). Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event. *Toxicology*, 278 (2), 211-216.

- [111] Li, X., Gilmour, P., Donaldson, K., MacNee, W. (1996). Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax*, 51 (12), 1216-1222.
- [112] Dasgupta, A., Klein, K. (2014). *Antioxidants in food, vitamins and supplements: prevention and treatment of disease*. Academic Press.
- [113] Ho, H.-y., Cheng, M.-l., Chiu, D.T.-y. (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase—from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep*, 12 (3), 109-118.
- [114] Xu, Y., Gu, Y., Qian, S. (2012). An advanced electron spin resonance (ESR) spin-trapping and LC/(ESR)/MS technique for the study of lipid peroxidation. *Int J Mol Sci*, 13 (11), 14648-14666.
- [115] Hall, C. (1997). Structure-activities of natural antioxidants, S. Cuppett (Ed.), in *Antioxid Meth In Vivo In Vitro Concept* (s. 2-29). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- [116] Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272 (33), 20313-20316.
- [117] Birch-Machin, M., Russell, E., Latimer, J. (2013). Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. *Brit J Dermatol*, 169, 9-14.
- [118] Roleira, F.M., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem*, 183, 235-258.
- [119] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *J Biochem Cell Biol*, 39 (1), 44-84.
- [120] Sena, L.A., Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 48 (2), 158-167.
- [121] López-Alarcón, C., Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*, 763, 1-10.
- [122] Gülçin, İ. (2002): Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes and investigation of some in vivo properties of nettle (*Urtica dioica*). Ph. D. Thesis, Atatürk University.

- [123] Ighodaro, O., Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *J Med*, 54 (4), 287-293.
- [124] Tanker, N., Koyuncu, M., Coskun, M. (2007). *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, Ankara Üniv. Ankara: Ecz. Fak. Yayınları.
- [125] Caliskan, O. (2015). Mediterranean hawthorn fruit (*Crataegus*) species and potential usage, in *The Mediterranean Diet* (s. 621-628). Elsevier.
- [126] AVCI, M., AKSOY, N. (2014). *Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları-I*. Ankara: TC Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü.
- [127] Orbán-Gyapai, O., Liktör-Busa, E., Kúsz, N., Stefkó, D., Urbán, E., Hohmann, J., Vasas, A. (2017). Antibacterial screening of *Rumex* species native to the Carpathian Basin and bioactivity-guided isolation of compounds from *Rumex aquaticus*. *Fitoterapia*, 118, 101-106.
- [128] Vasas, A., Orbán-Gyapai, O., Hohmann, J. (2015). The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 175, 198-228.
- [129] Dénes, A., Papp, N., Babai, D., Czúcz, B., Molnár, Z. (2012). Wild plants used for food by Hungarian ethnic groups living in the Carpathian Basin. *Acta Soc Bot Pol*, 81 (4)
- [130] Harshaw, D., Nahar, L., Vadla, B., Sarker, S.D. (2010). Bioactivity of *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae). *Arch Biol Sci*, 62 (2), 387-392.
- [131] Pedersen, J., Fransson, A.-M., Olsson, P.A. (2011). Performance of *Anisantha* (*Bromus*) *tectorum* and *Rumex acetosella* in sandy calcareous soil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206 (3), 276-281.
- [132] Kontogiorgis, C., Ntella, M., Mpompou, L., Karallaki, F., Athanasios, P., Hadjipavlou-Litina, D., Lazari, D. (2016). Study of the antioxidant activity of *Thymus sibthorpii* Benth (Lamiaceae). *J Enzym Inhib Med Ch*, 31 (sup4), 154-159.
- [133] Raudone, L., Zymone, K., Raudonis, R., Vainoriene, R., Motiekaityte, V., Janulis, V. (2017). Phenological changes in triterpenic and phenolic composition of *Thymus* L. species. *Ind Crop Prod*, 109, 445-451.
- [134] Mathews, V., Tuzlaci, E. (1984). Asphodeline Reichb. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 8, 88-97.

- [135] Tuzlaci, E. (1987). Revision of the genus *Asphodeline* (Liliaceae)-a new infrageneric classification. *Candollea*, 42 (2), 559-576.
- [136] Ocak, A. (2010). *Eskişehir Çatacık florası*. Eskişehir Belediye Başkanlığı.
- [137] Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, 55-74.
- [138] Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
- [139] Camps, J., Iftimie, S., Garcia-Heredia, A., Castro, A., Joven, J. (2017). Paraoxonases and infectious diseases. *Clin Biochem*, 50 (13-14), 804-811.
- [140] Luciano-Mateo, F., Cabré, N., Nadal, M., García-Heredia, A., Baiges-Gaya, G., Hernández-Aguilera, A., Camps, J., Joven, J., Domingo, J.L. (2018). Serum concentrations of trace elements and their relationships with paraoxonase-1 in morbidly obese women. *J Trace Elem Med Bio*, 48, 8-15.
- [141] Arenas, M., Rodríguez, E., Sahebkar, A., Sabater, S., Rizo, D., Pallisé, O., Hernández, M., Riu, F., Camps, J., Joven, J. (2018). Paraoxonase-1 activity in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hemat*,
- [142] Chistiakov, D.A., Melnichenko, A.A., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19-27.
- [143] Gomathi, P., Iyer, A.C., Murugan, P.S., Sasikumar, S., Raj, N.B.A.J., Ganesan, D., Nallaperumal, S., Murugan, M., Selvam, G.S. (2018). Association of paraoxonase-1 gene polymorphisms with insulin resistance in South Indian population. *Gene*, 650, 55-59.
- [144] Calik, M., Oguz, E., Sarikaya, S., Kocaturk, O., Koca, B., Gungor, H.E., Aksoy, N., Yoldas, T.K., Iscan, A. (2014). An evaluation of serum paraoxonase together with arylesterase activities and oxidative stress in children with intractable epilepsy: a cross-sectional study. *Epilepsy Res*, 108 (9), 1591-1596.
- [145] Beydemir, Ş., Demir, Y. (2017). Antiepileptic drugs: Impacts on human serum paraoxonase-1. *J Biochem Mol Tox*, 31 (6), e21889.
- [146] Nishio, E., Watanabe, Y. (1997). Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Bioph Res Co*, 236 (2), 289-293.

- [147] Türkeş, C., Söyüt, H., Beydemir, Ş. (2016). In vitro inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified paraoxonase-I (hPON1) from human serum. *Environ Toxicol Phar*, 42, 252-257.
- [148] Rodgers Dinstel, R., Cascio, J., Koukel, S. (2013). The antioxidant level of Alaska's wild berries: high, higher and highest. *Int J Circumpol Heal*, 72 (1), 21188.
- [149] Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biochem Sci*, 4 (2), 89.
- [150] Singh, P., Chandra, A., Mahdi, F., Roy, A., Sharma, P. (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J Clin Biochem*, 25 (3), 225-243.
- [151] Edwards, J.E., Brown, P.N., Talent, N., Dickinson, T.A., Shipley, P.R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochem*, 79, 5-26.
- [152] Locatelli, M., Zengin, G., Uysal, A., Carradori, S., De Luca, E., Bellagamba, G., Aktumsek, A., Lazarova, I. (2017). Multicomponent pattern and biological activities of seven Asphodeline taxa: potential sources of natural-functional ingredients for bioactive formulations. *J Enzym Inhib Med Ch*, 32 (1), 60-67.
- [153] Zengin, G., Aktumsek, A., Girón-Calle, J., Vioque, J., Megías, C. (2016). Nutritional quality of the seed oil in thirteen Asphodeline species (Xanthorrhoeaceae) from Turkey. *Grasas Aceites*, 67 (3), 141.
- [154] Zengin, G., Locatelli, M., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2016). Anthraquinone profile, antioxidant and enzyme inhibitory effect of root extracts of eight Asphodeline taxa from Turkey: can Asphodeline roots be considered as a new source of natural compounds? *J Enzym Inhib Med Ch*, 31 (5), 754-759.
- [155] Yu, X., Wang, F., Li, J., Shan, W., Zhu, B., Wang, J. (2017). Separation and characterization of unknown impurities and isomers in flomoxef sodium by LC-IT-TOF MS and study of their negative-ion fragmentation regularities. *J Pharmaceut Biomed*, 140, 81-90.
- [156] Release, S. (2016). Schrödinger suite 2016-2 induced fit docking protocol. *Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY*,
- [157] Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J.-P., Dublet, B., Masson, P., Rochu, D. (2006). Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *J Chromatography*, 836 (1-2), 15-21.

- [158] Duong-Ly, K.C., Gabelli, S.B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation, in *Methods in enzymology* (s. 85-94). Elsevier.
- [159] Jungbauer, A., Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography, in *Methods in Enzymology* (s. 349-371). Elsevier.
- [160] Segel, I.H. (1975). Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. *Horiz In Biochem Bioph*,
- [161] 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.
- [162] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680.
- [163] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *Jpn J N Diet*, 44 (6), 307-315.
- [164] 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.
- [165] 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.
- [166] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617), 1199.
- [167] 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.
- [168] 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.
- [169] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in *Methods in Enzymology* (s. 152-178). Elsevier.
- [170] Grela, E., Kozłowska, J., Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta Histochem*,

- [171] MOSSMANM, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunogenet*, 21, 235.



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

Sayı : 25403353-050.99-E.118241
Konu : 2018 - 223 Karar

08/11/2018

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

Sorumlu Araştırmacısı olduğunuz **“İnsan Serumundan Paraoksonaz-1 (PON-1) İzoenziminin Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”** 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/c9a9fe99-b7ed-402a-a474-8251485d35ff>

Adres : Meselik Kampüsü PK:26480 Odunpazari
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
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

Prof.Dr.Ömür ŞAYLIGİL
(Başkan)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Doç.Dr.Ömer KILIÇ
(Başkan Yardımcısı)

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

Doç.Dr.Özlem ÖRSAL
(Raportör)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Halk Sağ.Hemşireliği Anabilim Dalı

Doç.Dr.Uğur BİLGE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Aile Hekimliği Anabilim Dalı

Prof.Dr.Setenay DİNÇER ÖNER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyoistatistik 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.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:
24.09.2018

Çalışmanın Başlığı:

“İnsan Serumundan Paraoksonaz-1 (PON-1) İzoenziminin Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”

Çalışmacılar:

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

Çalışmanın değerlendirildiği ilk toplantı tarihi:

09.10.2018

Sonuç:

1. Araştırma broşüründe “Yüksek Lisans Tezi” olarak kodlanan araştırmanın kime ait olduğu belirlenmelidir.
2. Araştırmaya ilişkin gönüllülerden sağlanacak onam formunun yeniden düzenlenmesi önerilmektedir.
3. Araştırmaya ait bütçe ayrıntılı olarak kurulumuza iletilmelidir.

Çalışmacılardan gelen düzeltme metni tarihi:

31.10.2018

Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR’in yazısı

“İnsan Serumundan Paraoksonaz-1 (PON-1) İzoenziminin Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı yüksek lisans tezi, danışmanlığını yürütmekte olduğum tezli yüksek lisans öğrencisi Oya BÜYÜKEMİR’e (TCKN 30115317922) aittir. Tez ile ilgili yapılacak deneysel çalışmalar Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarı imkanları ile yürütülecektir. Bilgilerinize arz ederim.

Çalışmanın değerlendirildiği ikinci toplantı tarihi: 06.11.2018	Sonuç: 1. Gönüllülerin sağlığı, hakları ve güvenliği dikkate alınması gereken en önemli hususlardır. Bu hususlar bilimin ve toplumun çıkarlarından aha önde gelir. 2. Bilgi gizliliğinin sağlanması gereken en önemli durumlardan biri görüşmeler esnasındaki gizliliklerdir. 3. Gönüllünün sağlığına ve diğer kişilik haklarına zarar verilmemesi için gereken bütün tedbirler alınmalıdır. 4. Araştırmacılar İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (2015), Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi (2013)'ni imzalamış bu imza ile sorumluluğu kabul ettiklerini beyan etmişlerdir. 5. Araştırmacıların yetkin ve bu araştırma için yeterli oldukları anlaşılmaktadır.
Karar Tarihi: 06.11.2018 Karar No: 10	Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR (Yüksek Lisans Tez Danışmanı) sorumluluğunda yürütülen <i>“İnsan Serumundan Paraoksonaz-1 (PON-1) İzoenziminin Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”</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. Ömer KILIÇ (Başkan Yardımcısı)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/ Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı	
3	Doç. Dr. Özlem ÖRSAL (Raportör)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir Sağlık Bilimleri Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı	
4	Doç. Dr. Uğur BİLGE	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı	
5	Prof. Dr. Setenay DİNÇER ÖNER	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	
6	Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı	
7	Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
8	Prof. Dr. Timuçin KAŞİFOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı / Romatoloji Bilim Dalı	
9	Doç. Dr. Batu Can YAMAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı	
10	Prof. Dr. Bekir YAŞAR	Genel Cerrahi Uzmanı	
11	Av. Önder CAN	Hukuk	