



**BAZI FLAVONOİDLERİN ANTiOKSiDAN
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE
İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mine AKSOY

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREViOĞLU

2016

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN
SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mine AKSOY

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2016**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU danışmanlığında, Mine aksoy tarafından hazırlanan bu çalışma .22.../.07./2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 11.08.2016 tarih ve 32. / . 26 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mine AKSOY

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Bu tez kapsamında baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidlerinin antioksidan kapasiteleri incelendi. Çalışmada kullanılan flavonoidlerin antioksidan kapasitesini ölçmek için demir indirgeme aktivitesi, kuprik iyonları (Cu^{+2}) indirgeme aktivitesi, FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{+3}) indirgeme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikalini (DPPH $\cdot$) giderme, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikalini (ABTS $^{+}$) giderme aktivitesi yöntemlerinden yararlanıldı. Sonuçların mukayese edilmesinde bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), α -tokoferol ve troloks standart antioksidanları kullanıldı. Ayrıca baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidlerinin bir detoksifikasyon enzimi olan ve metabolik öneme sahip glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı. Çalışmada kullanılan GST enzimi için kaynak olarak insan eritrositleri kullanıldı. İnsan eritrositlerin GST enzimi glutatyon-agaroz afinite kolonu yardımıyla 3,309 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle 1140 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi. Saflaştırılan enzim üzerine baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidlerinin inhibisyon etkilerini incelemek amacıyla önce beş farklı inhibitör konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçüldü ve % Aktivite-[İnhibitör] grafiği çizildi. Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri çizilen bu grafik yardımıyla sırasıyla 0,028; 0,056; 0,769 mM olarak hesaplandı. Enzim inhibitör ayrışma sabiti olan K_i değerleri ise sırasıyla 0,0145; 0,024; 0,762 mM olarak bulundu.

2016, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Baicalin, Baicalein, Phloridzin, Glutatyon S-transferaz, Antioksidan

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF SOME FLAVONOİD, PURIFICATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FROM HUMAN ERYTHROCYTE AND INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT ON ENZYME ACTIVITY

MİNE AKSOY

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

In this thesis, antioxidant capacity of baicalin, baicalein and phloridzin flavonoids were examined. To measure the antioxidant capacity of flavonoids used in the study, iron reduction activity, cupric ions (Cu^{2+}) reduction activity, ferric ion according to the FRAP method (Fe^{3+}) reduction activity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (DPPH $\cdot$) removal activity, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenztiyoazol-6-sulfonic acid) radical (ABTS $\cdot$ +) removal activity methods were used. Butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), α -tocopherol and trolox standards antioxidants were used for a comparison of the results. In addition *in vitro* inhibitory effect of baicalin, baicalein and phloridzin flavonoids were investigated on the glutathione S-transferase (GST) enzyme activity. Human erythrocytes as a source of GST enzymes in the study was used. GST enzymes of erythrocyte with the help of glutathione-agarose affinity column was purified with 3.309 EU/mg protein specific activity and 1140-fold. The purity of the enzyme were checked with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). IC_{50} values baicalin, baicalein and phloridzin flavonoids, respectively, as 0.028, 0.056, 0.769 mM was calculated with % Activity-[Inhibitory] graphs. Values inhibitor dissociation constant of the enzyme, K_i , were found as 0.0145, 0.024, 0.762 mM, respectively.

2016, 70 pages

Keywords: Baicalin, Baicalein, Phloridzin, Glutathione S-transferase, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarım esnasında bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Prof. Dr. Sayın Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, bilgi ve deneyimleriyle tez çalışmalarımda bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Sayın İlhami GÜLÇİN'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca katkılarından dolayı Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım, Prof. Dr. Sayın Hasan ÖZDEMİR'e ve Yrd. Doç. Dr. Sayın Halis ŞAKİROĞLU'na ayrıca tüm laboratuvar arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mine AKSOY

Haziran, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller.....	2
1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Kaynakları.....	4
1.3. Oksidatif Stresin Temeli.....	6
1.4. Antioksidan Savunma.....	8
1.4.1. Antioksidan bileşikler.....	9
1.4.2. Antioksidan enzim ve proteinler	10
1.5. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Savunmaya Katkısı	12
1.6. Çalışmada Kullanılan Flavonoidler.....	14
1.6.1. Baicalin.....	14
1.6.2. Baicalein	15
1.6.3. Phloridzin	15
1.7. Glutasyon S-transferaz.....	16
1.7.1. Glutasyon ve glutasyon transferaz	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	26
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	26
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	27
3.1.3.a. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	27
3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	27
3.1.3.c. DPPH [•] serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler	28

3.1.3.d. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler	28
3.2. Antioksidan Çalışmalar	31
3.2.1. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi	31
3.2.2. Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu).....	31
3.2.3. FRAP indirgeme kapasitesi	32
3.2.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi	32
3.2.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi	32
3.3. İnsan Eritrosit GST Enziminin Saflaştırılması	33
3.3.1. Kan temini ve hemolizat hazırlanması	33
3.3.2. Afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması	33
3.3.3. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü	34
3.3.4. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini.....	35
3.3.5. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine tez kapsamındaki fenolik bileşiklerin etkisinin belirlenmesi	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	38
4.1.1. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kuvveti bulguları.....	38
4.1.2. Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları.....	39
4.1.3. FRAP indirgeme kuvveti bulguları	40
4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	42
4.1.5. $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesi bulguları	44
4.2. Glutasyon S-transferaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	47
4.2.1. GST enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	47
4.2.2. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	48
4.2.3. GST enzim aktivitesi üzerine tez kapsamındaki fenolik bileşiklerin etkisinin belirlenmesi ilgili yapılan çalışma sonuçları	49
4.2.3.a. Baicalin flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sonuçları	49

4.2.3.b. Baicalein flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi	
sonuçları	50
4.2.3.c. Phloridzin flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi	
sonuçları	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	70



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
EÜ	Enzim Ünitesi
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
GST	Glutatyon S-transferaz
I	İnhibitör
IC ₅₀	Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
PER	Amonyum persülfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Oksijenin indirgenme basamakları	3
Şekil 1.2. Hidrodioksil radikali ve süperoksit.....	3
Şekil 1.3. Reaktif oksijen türlerinin üretim mekanizmasının şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.4. Süperoksitin dismutasyonu.....	7
Şekil 1.5. Hidroksil radikali üretimi	7
Şekil 1.6. Antioksidan enzimlerin mekanizması	11
Şekil 1.7. İnsan GSTP1-1 kristalografik yapısı	18
Şekil 3.1. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması	35
Şekil 4.1. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) Fe^{+3}/Fe^{+2} indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	39
Şekil 4.2. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu^{+2}), kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	40
Şekil 4.3. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksini $[Fe^{+3}-(TPTZ)_2]^{+3}$ ferröz kompleksine $[Fe^{+2}-(TPTZ)_2]^{+2}$ indirgeme kapasitesi standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	41
Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	43
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin (10–30 µg/ml) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	44
Şekil 4.6. ABTS'nin açık kimyasal yapısı	45
Şekil 4.7. $ABTS^{+}$ radikal giderme aktivitesi tayininde kullanılan $ABTS^{+}$ için hazırlanan standart grafik	45

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ radikal giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..	46
Şekil 4.9. Glutasyon-agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılan insan eritrosit GST enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı	49
Şekil 4.10. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Baicalin] grafiği	50
Şekil 4.11. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi	50
Şekil 4.12. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine baicalein flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Baicalein] grafiği	51
Şekil 4.13. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi	51
Şekil 4.14. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine phloridzin flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Phloridzin] grafiği	52
Şekil 4.15. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine phloridzin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antioksidan bileşikler	9
Çizelge 1.2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	14
Çizelge 3.1. Elektroforez jellerinin hazırlanması	35
Çizelge 3.2. GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür	36
Çizelge 4.1. 20 µg/ml konsantrasyonunda baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kuvveti, Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti ve FRAP indirgeme kuvveti metotlarıyla birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları	42
Çizelge 4.2. Baicalin, baicalein, phloridzin çözeltilerinin DPPH $\cdot$, ABTS $^{+}$ radikali giderme aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	47
Çizelge 4.3. İnsan eritrositlerinden Glutasyon Agaroz afinite kolonu ile saflaştırılan GST enziminin saflaştırma sonuçları	48
Çizelge 4.4. GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri için hesaplanan IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türü	53

1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda üretilmesi durumunda organizmaların doğal antioksidan savunma sistemleri devreye girerek canlıyı bu durumdan kurtarmak üzere antioksidan bileşikler üretir (Rice-Evans 1997). Sekonder metabolit olarak adlandırılan bu bileşikler özellikle bitkiler tarafından bolca üretilir. Genel olarak fenolik bileşikler sınıfında olan bu metabolitler insanlar tarafından beslenme yoluyla tüketildiğinde antioksidan aktivitelerini insan vücudunda da gösterebilirler (Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999). Bu nedenle son yıllarda insanlar tarafından besin kaynaklı doğal antioksidanların alınması özendirilmektedir. Öte yandan antioksidan bileşikleri bolca içeren bitki ekstraktlarının (Karagozler, Erdag *et al.* 2008) besin endüstrisinde koruyucu madde olarak kullanılması da son yıllarda oldukça sık rastlanan bir uygulamadır. Bununla beraber, besin teknolojisinde besinlerin uzun süre dayanıklılığını sağlamak için katkı maddesi olarak sentetik antioksidanlar kullanılır. Bu sentetik antioksidanların koruyucu özellikleri çok yüksek olmakla birlikte doğal olmamaları nedeniyle insan sağlığı açısından zararlı olabilecekleri konusunda tartışmalar vardır (Pokorny 2007). Doğal antioksidanların antioksidan özelliklerinin moleküler yapılarıyla alakalı olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Rice-Evans 1997; Pannala Chan *et al.* 2001; Apak *et al.* 2007). Antioksidanlar serbest radikalleri giderme/uzaklaştırma yetenekleri nedeniyle son yıllarda insan beslenmesinde incelenen önemli araştırma konularından birini oluşturmaktadır. Ayrıca besin teknolojisinde besinlerin uzun süre bozulmadan saklanabilmesi için sentetik ve doğal antioksidanlarla muamele standart bir işlem olarak uygulanmaktadır. Besinlere ilave edilen antioksidan özellikli bileşikler sentetik (BHT, BHA gibi) olabileceği gibi genellikle bitkilerden elde edilen doğal antioksidan bileşikler (rutin, katekol gibi) de olabilir. Bu bileşiklerin hem besin koruma özellikleri hem de metabolizmaya girdikten sonra antioksidan olarak davranıp hücreyi oksitleyici maddelere karşı koruma özellikleri bilinmektedir.

Bileşiklerin antioksidan özelliklerini belirlemede çeşitli analitik yöntemler uygulanır. Bu yöntemlerde kimyasal prensipler geçerli olup bir antioksidan, seçilen bir ölçme yöntemi ile yüksek antioksidan aktivite gösterirken aynı antioksidan diğer bir yöntemle

daha düşük bir aktivite gösterebilir. Bu nedenle sentetik veya doğal antioksidanların antioksidan kapasitelerinin tespitinde ve karşılaştırmalarda en az iki yöntem kullanılarak çalışılmalıdır.

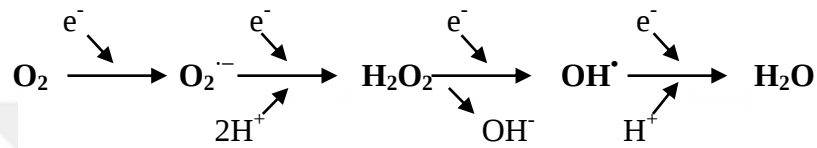
Önceki literatür çalışmaları bir antioksidan bileşiğin bir yöntemle ölçülen antioksidan kapasitesinin diğer bir yöntemle ölçülene kıyasla farklı olabileceğini göstermektedir (Huang *et al.* 2005). Bu nedenle, bir bileşiğe ‘antioksidan kapasitesi yüksek’ özelliği yakıştırabilmek için birden fazla yöntemle tayininin yapılması ve diğer bileşiklerle karşılaştırılması gerekir. Karşılaştırma sentetik ve doğal antioksidanlar arasında yapıldığında, daha ucuz ve daha kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle besin endüstrisinde çokça kullanılan sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilecek doğal antioksidanların tespit edilmesi mümkün olabilir.

1.1. Serbest Radikaller

Oksidatif stres, oksijen açısından zengin bir ortamda yaşamın kaçınılmaz sonucudur. Aerobik organizmalar için oksijen hem hayati hem de tehlikelidir. Bu paradoks oksijenin atomik serbest radikal formu ve moleküler bi-radikal formu bulunan kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır. Atomik oksijenin dış valans kabuğunda bir eşleşmemiş elektron bulunur. İki oksijen atomu moleküler oksijen oluşturmak üzere bir araya geldiklerinde, dış değerlik kabuğunda elektron-çifti oluşturmaz, iki eşleşmemiş elektron olarak kalırlar. Radikal bir atom ya da molekülün dış değerlik kabuğunda bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içermesi olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, moleküler oksijen gerçek bir bi-radikalidir (Chance *et al.* 1979; Pryor 1986; Mccord and Fridovich 1988).

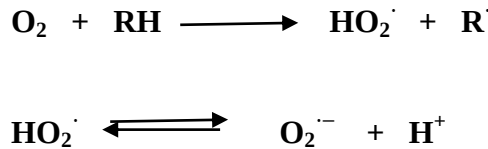
Moleküler oksijen radikal doğası gereği bazı oksidasyon / redüksiyon reaksiyonlarının gerçekleşmesine neden olur (Chance *et al.* 1979; Pryor 1986; Mccord and Fridovich 1988). Oksijen Şekil 1.1’de gösterildiği gibi dört basamakta indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zincirinin sonunda sitokrom oksidaz tarafından katalizlenen oksijenin dört elektron alarak indirgenmesi reaksiyonu aksine, enzimatik olmayan yolla oksijenin

indirgenmesi birçok reaktif ara maddenin üretilmesiyle sonuçlanır. Oksijenin ilk bir-elektronla indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali oluşur. İkinci bir elektron ve iki proton eklenmesi ile aktif türler arasında yer alan hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilir. Üçüncü elektron ilavesi ile son derece reaktif hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) üretilir ve serbest bir hidroksit iyonu (OH^-) açığa çıkar. Dördüncü elektron ilavesi zararsız bir su molekülü oluşturur (Davies 1995).



Şekil 1.1. Oksijenin indirgenme basamakları

Şekil 1.1.'de gösterilen O_2 bi-radikal ve $\text{O}_2^{\bullet -}$ ise mono-radikaldır oysa H_2O_2 reaktif oksijen türü olmasına rağmen dış değerlik kabuğunda eşleşmiş elektron bulunduğu için dolayı radikal değildir. Ayrıca bir indirgeyici reaktant tarafından hidrojen transferi ile moleküler oksijenden üretilen geçici hidrodoksil türleri bir proton vererek sıklıkla süperoksit radikal anyonuna dönüşür. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi hidrodoksil radikali fizyolojik pH'da hızlı bir şekilde $\text{O}_2^{\bullet -}$ ve H^+ oluşturmak üzere ayrılabilir. Hidrodoksil radikalının pK_a 'sı 4,8 olduğundan iç mitokondri membranının dış yüzeyinin asidik oluşu dolayısıyla ve nötrofiller, makrofajlar ve monositlerin fagolizozomlarında sınırlı konsantrasyonlarda oluşur (Fridovich 1976).



Şekil 1.2. Hidrodoksil radikali ve süperoksit

Birçok oksijen türü biyolojik oksidanlar olarak hareket eder; ama $\text{O}_2^{\bullet -}$ ara reaktiftir. $\text{O}_2^{\bullet -}$ 'ye bir protonun eklenmesiyle bu ara reaktant, aktif oksitleyici ajan olan $\text{HO}_2^\bullet$ 'ye

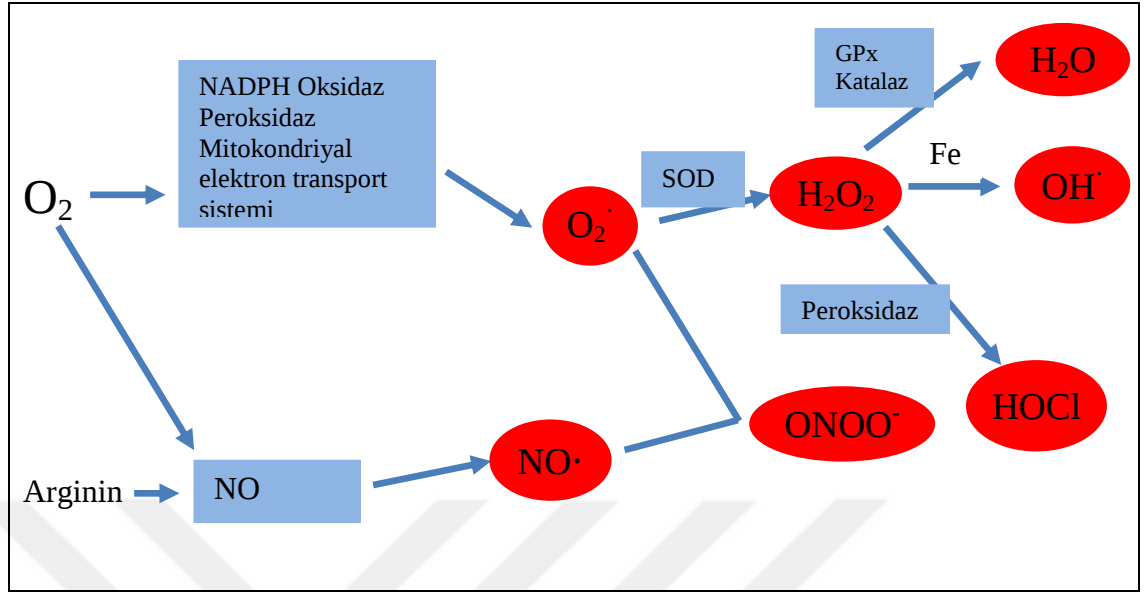
dönüşür (Koppenol and Liebman 1984). Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) redoks reaksiyonları tarafından üretilmez ama elektromanyetik enerjinin absorpsiyonu ile oksijenin iki eşleşmemiş elektronlarından birinin spin yönü tersine çevrilir (Frimmer 1985).

1.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Kaynakları

İnsan hücrelerine giren oksijenin %95'inden fazlası, mitokondrial elektron transport sisteminde kompleks IV enzimi olan sitokrom oksidaz tarafından enerji üretimi için kullanılır; iki su molekülünün oluşumu ile sonuçlanan bu işlemler sırasında, her bir oksijen molekülü 4 e⁻ ilavesiyle suya indirgenir. Hücre içine alınan oksijenin tahminen %1-4'ünün kısmen indirgenmiş oksijen türlerine yani reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştüğü bilinmektedir (Floyd 1999).

Soluduğumuz tüm oksijenin %95'inden fazlası elektron taşıma zincirinde Kompleks IV enzimi sitokrom oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonla suya indirgenir. Sitokrom oksidaz elektron transport zincirindeki son elektron alıcıdır ve sürekli elektron transportunun gerçekleşmesi için indirgenme reaksiyonu devam etmelidir. Eğer elektron akışı durursa proton motif kuvveti oluşmaz ve ATP üretimi gerçekleşmez (Davies 1995).

Oksijen radikali üretiminde diğer potansiyel kaynaklar lökositler (nötrofiller), monositler ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerdir. Bu tür hücreler, doğrudan bir NADPH oksidaz enzim sistemi ile mikro-organizmalara savunma sırasında $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretir. Normal şartlarda NADPH oksidaz tarafından üretilen $\text{O}_2^{\cdot-}$ çoğu fagositik fagolizozomlarda mikroorganizmalara karşı yönlendirilmelidir. Kronik enflamasyon koşullar altında doku etrafında $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve onun metabolitleri yüksek seviyede bulunur. Bu tür kronik iltihap durumları, romatizmal artrit, lupus eritematozus ve psoriatik artrit gibi birçok hastalığın karakteristik özelliğidir (Babior 1992).



Şekil 1.3. Reaktif oksijen türlerinin üretim mekanizmasının şematik gösterimi

ROS en az bir tane eşleşmemiş elektron içeren veya radikal olmayan bileşik içeren ve biyomolekülleri oksitleyebilen moleküllerdir. Bu nedenle bu ara ürünler oksidan veya pro-oksidan olarak da adlandırılır (Gutteridge and Halliwell 1989; Sies 1991). ROS normal fizyolojik olaylar sırasında sürekli olarak üretilir ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna, lipid peroksitlerinin birikmesine yol açar (Elmastas *et al.* 2006; Gulcin 2010). Fizyolojik konsantrasyonlarda ROS normal hücre fonksiyonları için gerekli olabilir. Nükleik asitler, lipidler, proteinler, doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi önemli biyomoleküllere de zarar verirler. Mutasyona kadar varan DNA hasarlarına da sebep olabilirler. Eğer ROS hücresel öğeler tarafından etkili bir şekilde giderilmezse, protein, lipid, nükleik asit gibi hücresel biyomoleküllere zarar veren serbest radikal zincir reaksiyonunu uyarabilir (Halliwell and Gutteridge 1990).

Biyolojik moleküllerin oto-oksidasyonu *in vivo* olarak oksijen radikali üretiminin oldukça önemli bir kaynağı olabilir. Lipitler, proteinler, karbohidratlar, DNA ve RNA gibi indirgenmiş karbon bileşikleri oksidasyona hassastırlar. Membran lipidlerinin oto-oksidasyonu konusuna büyük ilgi vardır ve bu ilgi gıda kimyasında antioksidan bileşiklerin geliştirilmesi ve gıdaların bozulmadan uzun süre depolanabilmesi gibi önemli avantaj sağlar. Başlangıçta oto-oksidasyon reaksiyonları gibi görünen protein,

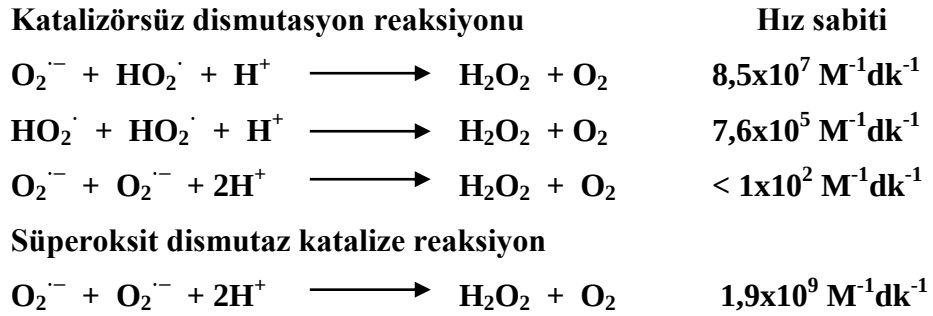
yağ, karbonhidrat ve nükleik asit oksidasyonu detaylı incelemelerden sonra metal katalize oksidasyonlar olduğu anlaşılmıştır. Enzimatik olmayan biyolojik oksidasyonda demir ve bakır gibi geçiş metallerinin rolü yadsınmaz (Kappus and Diplock 1992).

1.3. Oksidatif Stresin Temeli

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri veya diğer serbest radikaller ile antioksidan sistem arasında oluşan dengesizliktir ve bu dengesizlik hücreler, dokular veya organizmalar da protein, lipid, karbohidrat, nükleik asit gibi önemli moleküllerin hasarına neden olabilir (Gulcin 2012).

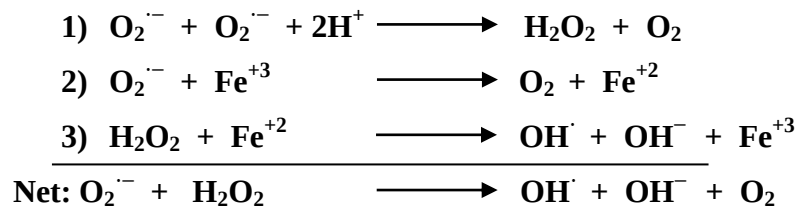
Proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitlerin oksidatif modifikasyona hassasiyetini anlamak için çeşitli serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin bu biyomoleküllere etkisi incelenmiştir. Süperoksit lipidler, karbohidratlar ya da nükleik asitlere karşı reaktif değildir, ama belirli proteinlere sınırlı reaktivlik gösterir. Süperoksitin hem grupları veya demir-sülfür kümeleri gibi prostetik grup olarak geçiş metal iyonu içeren proteinlere karşı reaktif olduğu kanıtlanmıştır. Bu tür geçiş metali aracılı reaksiyonlar amino asitlerin hasarı ile sonuçlanır ve enzim ya da protein fonksiyonunu kaybeder. Bu reaksiyonlara iyi bir örnek bakterinin süperoksite maruz kalmasına takiben akonitaz aktivitesini kaybetmesidir (Zhang *et al.* 1990; Gardner and Fridovich 1991).

Süperoksitin diğer önemli reaksiyonu Şekil 1.4'de gösterildiği gibi, bir diğer süperoksit molekülü ile aralarındaki reaksiyondur. Şekil 1.4'de gösterilen reaksiyonların hepsi $O_2^{\cdot -}$ veya $HO_2^{\cdot}$ 'nin bir molekülünün birinin indigen diğerinin yükseltgen olarak davrandığı dismutasyon reaksiyonlarıdır. H_2O_2 ve O_2 , süperoksit dismutasyonunun ürünleridir. Süperoksit dismutasyonu için reaksiyon hız sabitleri oldukça önemli ölçüde değişiklik gösterir. Süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği reaksiyon hız sabitide Şekil 1.4'te belirtilmiştir (Davies 1995).



Şekil 1.4. Süperoksitin dismutasyonu

Hidrojen peroksit birden fazla oksidasyon ile oluşturulan önemli bir ortak ara-maddedir. Hidrojen peroksit, özellikle sülfhidril grupları, demir-sülfür kümeleri, indirgenmiş hem grupları ve prostetik grup olarak bakır içeren birçok biyolojik molekül için oksidandır. Hidrojen peroksit ayrıca geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturabilir. Şekil 1.5'te gösterilen üçüncü reaksiyon indirgenmiş demirin H_2O_2 ile $\cdot OH$ oluşturduğu oksidasyon reaksiyonudur ve 1894'de Fenton tarafından tanımlanmıştır (Fenton 1894). Bununla birlikte, $O_2^{\cdot -}$ Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye dönüştürmek için bir indirgeyici olarak davranabilir. Bu 'demir katalizör Haber-Weiss reaksiyonu' ilk 1934 yılında birkaç olası reaksiyon şemaları biri olarak önerilmiştir ve son yıllarda oldukça yaygın destek görmüştür (Haber F 1934). Bir geçiş metali olan bakır da belirtilen reaksiyonlarda demirin yerini alabilir. Hidroksil radikali, tüm oksijen radikallerinin en reaktifidir ve hali hazırda protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asitleri oksitler (Mccord and Day 1978).



Şekil 1.5. Hidroksil radikali üretimi

Oksijen temelli diğer bazı türler de oksidatif strete önemli rol oynar. En yaygın olanlarından biri fizyolojik pH'da 50/50 oranında bulunan hipokloröz asit ya da

hipoklorittir. HOCl / OCl⁻ nötrofiller gibi fagositik hücrelerde miyeloperoksidaz enzimi tarafından üretilir. NADPH oksidaz enzimi fagositlerde O₂'den O₂^{•-} üretir (Babior 1992). Oluşan O₂^{•-} süperoksit dismutaz enzimi ile H₂O₂'ye dönüşür.(Şekil 1.3) Daha sonra H₂O₂ miyeloperoksidaz enzimi ile hipokloröz asit / hipoklorite oksitlenir. Fagositik hücreler bakteri gibi işgalci organizmaları öldürmek için HOCl / OCl⁻'yi kullanırlar. HOCl / OCl⁻ doğrudan proteinleri oksitleyebilir ve birden fazla etkiye yol açabilen kloramin gibi ikincil oksidanlar üretebilir (Mckenna and Davies 1988; Davies Horwitz *et al.* 1994).

Çeşitli azot oksitler yaygın çevresel kirleticilerden üretilir ve bazıları hücrelerde oluşturulur. Nitrik oksit (NO[•]) ve azot dioksit (NO₂) fotokimyasal sis ortak bileşenleridir (Kerr 1976). Ancak nitrik oksit, fizyolojik bir damar genişletici olarak memeli dokularında nitrik oksit sentaz enzimi tarafından oluşturulur (Moncada *et al.* 1991). NO[•] ya direkt olarak ya da peroksinitrit (ONOO⁻) gibi türler üreterek hücrelerimizde oksidatif strese sebep olabilir (Beckman *et al.* 1990; Radi 1990; Last Sun *et al.* 1994).

Ozon oksidatif strese neden olan diğer bir oksijen türüdür (Last, Sun *et al.* 1994, Pryor 1994). Son yıllarda atmosferdeki ozon tabakasındaki delinme ciddi kaygıya yol açmıştır. Stratosferik seviyede ozon UV radyasyonu emer ve böylece hayvan ve bitki yaşamını korur. Aksi takdirde canlı hayatını tehdit edici, maruz kalma seviyelerine ulaşılır. Bununla birlikte atmosferin alt tabakalarında ozon güçlü oksitleyici özelliğinden dolayı kesinlikle istenmeyen bir durumdur(Koppenol and Liebman 1984, Last, Sun *et al.* 1994, Pryor 1994). Ne yazık ki ozon, NO[•] ve NO₂ endüstriyel atıktır. Canlıların çevresel atık olan ozon, nitrik oksit ve azot dioksit maruz kalması insanların sebep olduğu bir sorundur.

1.4. Antioksidan Savunma

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bunlar 'antioksidan savunma

sistemleri' ya da kısaca 'antioksidanlar' olarak bilinirler. İnsan da dâhil olmak üzere tüm aerobik organizmalar, oksidatif hasara karşı korunmak için bir dizi antioksidan savunma sistemine sahiptir (Quintanilha *et al.* 1982).

1.4.1. Antioksidan bileşikler

Hücrelerimizde oksidanlarla reaksiyona giren ve onları etkisiz hale getiren bir dizi antioksidan bileşik vardır (Çizelge 1.1) (Quintanilha *et al.* 1982; Davies 1986; Kappus and Diplock 1992; Rice-Evans 1997). E vitamini (α -tokoferol) membrana bağlı major antioksidan ve C vitamini (askorbik asit) major sulu faz antioksidanıdır. Bu bileşikler, aslında insan sağlığını korumada vitaminlerin hayati önemini vurgulamaktadır. C vitaminin E vitaminini indirgeyerek yeniden kullanılması için redoks çevrimi oluşturduğu *in vitro* şartlarda kanıtlanmıştır (Packer *et al.* 1979). Bu redoks çevriminin *in vivo* şartlarda da gerçekleşmesi antioksidan fonksiyon açısından önemlidir.

Çizelge 1.1. Antioksidan bileşikler

E Vitamini
Seruloplazmin
C Vitamini
Ferritin
β-Karoten
Selenyum
Glutasyon
Manganaz
Ubikinon
Çinko

Diğer yağda çözünür maddeler de *in vivo* önemli antioksidan rol oynayabilir (Tablo 1.1). Bunlar β -karoten ve ubikinon'dur (Quintanilha *et al.* 1982; Davies 1986; Kappus and Diplock 1992; Rice-Evans 1997). A vitamini (retinoik asit) türevi olan β -karoten,

çeşitli çalışmalarda besin takviyesi bir antioksidan olarak büyük umut vermektedir (Heinonen *et al.* 1994).

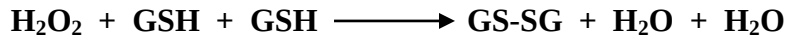
Diğer suda çözünür antioksidan bileşikler (Çizelge 1.1), ürik asit (Ames *et al.* 1981; Hochstein *et al.* 1985; Davies *et al.* 1986), glutatyon ve seruloplazmin (Gutteridge *et al.* 1980) oluşturur. İnsanda pürin metabolizmasının son ürünü ürik asit, geçiş metalleri için bir şelatör ve klasik bir oksidan giderici olması açısından ilgi çekicidir (Ames *et al.* 1981; Hochstein *et al.* 1985; Davies *et al.* 1986). Demir ve/veya bakırın ürik asitle bağlanması kendisi okside olmadan bu metallerin sebep olduğu oksidasyonu inhibe eder (Davies *et al.* 1986). Geçiş metalleri oksidasyona neden olurlar ancak bu metaller birçok antioksidan enzimin aktif bölgelerinin bileşenleridir. Daha ayrıntılı bakılacak olursa, süperoksit dismutaz ailesinin çeşitli üyeleri aktif bölgelerinde bakır, çinko, manganez, ya da demir gibi metal iyonları bulundurlar (McCord and Fridovich 1969; Fridovich 1976; Pryor 1986). Glutatyon peroksidazlar, aktif bölgesinde selenyum (Flohé 1982), katalazlar ise demir kullanmaktadır (Halliwell and Gutteridge 1990). Yani antioksidan enzimlerin çalışması için bu metaller mutlak olarak gereklidir. Bu açıdan bakıldığında selenyum, manganez, çinko, bakır ve demir gereksinimleri olan antioksidan bileşikler listesine dâhil edilmelidir. Bu önemli metallere eksik beslenme ciddi oksidatif bozukluklara neden olur. Örneğin, Yeni Zelanda'da selenyum açısından fakir topraklarda yetiştirilen otlar ve tahıllarda tehlikeli boyutlarda oksidatif hasar gözlenmiştir (McCord and Fridovich 1988; Rice-Evans 1997).

1.4.2. Antioksidan enzim ve proteinler

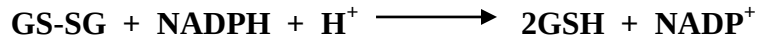
Aerobik organizmalar oksidatif hasarı en aza indirmek için çok sayıda antioksidan enzim sentezlerler. Bu enzimler arasında en iyi bilinen süperoksit dismutazdır (Fridovich 1976; Pryor 1986). SOD'ler Şekil 1.3 ve 1.4'de belirtildiği gibi $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ reaksiyonunu katalizlerler. Şekil 1.4'te de bildirildiği gibi bu önemli dismutasyon reaksiyon hız sabiti SOD de birkaç misli artmıştır. SOD ailesinin tüm üyeleri aktif bölgelerinde metal iyonu bulundurlar (Fridovich 1989). SOD'un

genetik silinmesi alt organizmalarda ölümcül mutasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Fridovich 1989). Bu sonuç SOD enzim ailesinin temel önemini destekler.

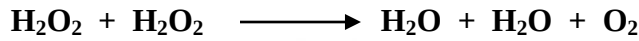
Glutasyon Peroksidaz:



Glutasyon Redüktaz:



Katalaz:



DT Diaforaz:



Şekil 1.6. Antioksidan enzimlerin mekanizması

SOD ürünü olan H_2O_2 toksiktir ve hızla ortadan kaldırılmalıdır. Memeli hücrelerinde bu işlem glutasyon peroksidaz (Flohé 1982) ve katalaz (Halliwell and Gutteridge 1990) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Hem glutasyon peroksidazlar hem de katalazlar H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürerek detoksifiye ederler. Glutasyon peroksidazlar L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisinden oluşan bir tripeptid olan glutasyonu (GSH) H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için indirgeyici güç olarak kullanır. İki molekül GSH disülfid-bağlı bileşik GS-SG oluşturmak üzere yükseltgenirken H_2O_2 'yi indirger. Oluşan GSSG glutasyon redüktaz enzimi ile NADPH kullanılarak tekrar GSH'a indirgenir (Flohé 1982).

Katalaz reaksiyon mekanizması glutasyon peroksidazdan (Şekil 1.6) daha basit görünür, ancak öyle değildir. Katalaz aktivitesi için de reaksiyon eşitliğinde olmamasına rağmen NADH/NADPH gerekli olduğu literatürlerde belirtilmiştir (Kirkman and Gaetani 1984).

H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda glutasyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinden hangisinin daha önemli rol oynadığı anlaşılması gereken temel sorudur. Kırmızı kan hücrelerinde glutasyon peroksidaz, hücrel metabolizma ve hemoglobinin oto-

oksidasyonu yoluyla üretilen H_2O_2 'yi düşük konsantrasyonlarda gidermekle sorumludur (Cohen and Hochstein 1963; Cohen and Hochstein 1964), oysa katalaz fenilhidrazin gibi oksitleyici ilaçlar tarafından üretilen yüksek konsantrasyonlarda H_2O_2 'yi giderir (Scott *et al.* 1993). Diğer hücrelerde katalazlar peroksizomlarda bulunur ve yağ asitlerinin β -oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksiti gidermede birinci derece sorumludur. Katalaz çoğu memeli hücresinde sitoplazmada bulunmaz. Sitoplazmada oluşan H_2O_2 ya peroksizomlara difüze olarak katalaz tarafından giderilir ya da sitoplazmada glutatyon peroksidaz tarafından giderilir (del Rio *et al.* 1992).

Bir diğer önemli antioksidan enzim kinon redüktaz olarak da adlandırılan DT diaforaz'dır (Lind *et al.* 1982). DT diaforaz doğrudan iki değerlikli (dehidro)kinonların (Q) (dihidro)kinollere (QH_2) indirgenmesini katalizler (Şekil 1.6). DT diaphorase bu reaksiyonu reaktif semikinon radikal ara ürünlerinin ($Q^{\cdot-}$ ve $QH^{\cdot}$ gibi) üretilmesine fırsat vermeden katalizler. DT diaphorase kinon türevi ilaçları ve çevresel ajanları kısmi olarak güvenli kinol formuna dönüştürerek diğer enzim sistemlerinin konjugasyonuna ve eliminasyonuna uygun hale getirir.

İki enzimatik olmayan protein, ferritin (Balla *et al.* 1992) ve seruloplazmin (Gutteridge *et al.* 1980), geçiş metali depolama ve *in vivo* antioksidan savunmada önemli rol oynarlar. Demir ve bakır gibi geçiş metalleri hem metal-katalize (oto) oksidasyona hem de süperoksit radikalinden hidroksil radikali üretimine katılırlar. Memeli hücrelerinde demir bağlayan ferritin ve plazmada bakır bağlayan seruloplazminin vücut sıvıları için antioksidan savunmaya önemli katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Gutteridge *et al.* 1980; Balla *et al.* 1992).

1.5. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Savunmaya Katkısı

Antioksidanlar metabolizmada indirgenmiş glutatyon (GSH), antioksidan enzim ve proteinler gibi *in vivo* olarak sentezlenebilir ya da diyetle alınırlar (Sies 1997; Halliwell 2007). Bitkiler eksojen yani diyetle alınan antioksidan kaynağıdır. Dünyadaki bitki türlerinin üçte ikisinin tıbbi öneme sahip olduğuna inanılır ve bunların hemen hemen

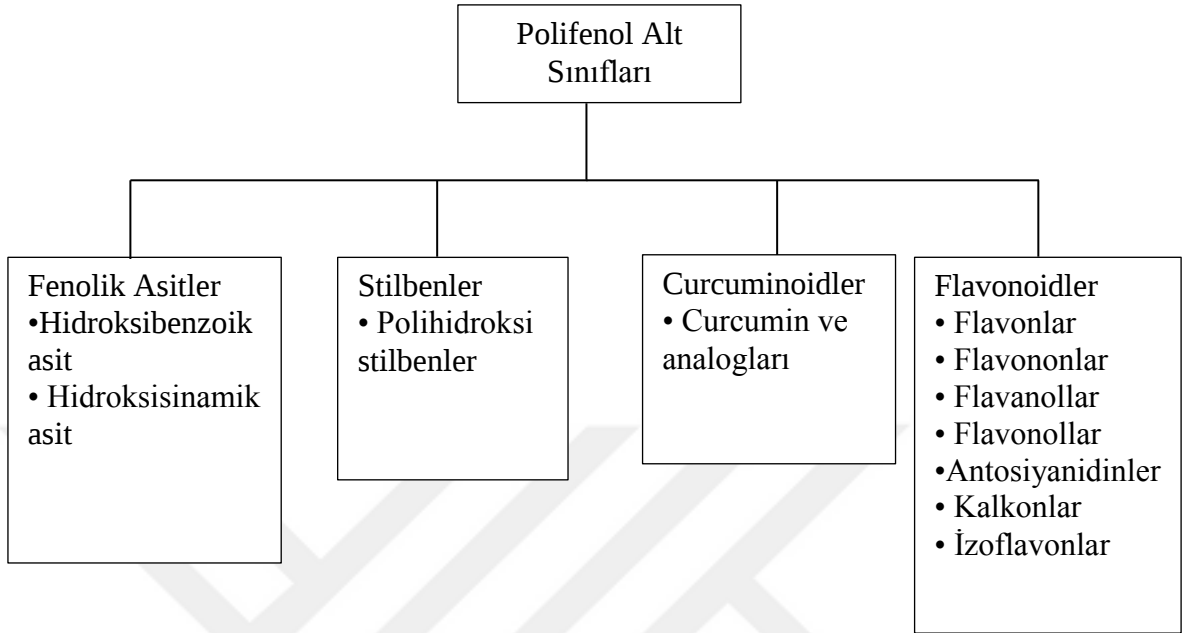
tümü mükemmel antioksidan potansiyele sahiptir (Krishnaiah *et al.* 2011). Eksojen antioksidan takviyesi ya da endojen antioksidan savunmanın arttırılması oksidatif stresin istenmeyen etkileri ile mücadelede etkili olduğu tespit edilmiştir (Kasote *et al.* 2013).

Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Güçlü 2009).

Fenolik bileşikler, anti-alerjik, anti-artherogenic, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, antioksidan, antitrombotik, kalp ve damar genişletici etki gibi fizyolojik özellikler gösterirler (Benavente *et al.* 1997; Samman 1998; Middleton *et al.* 2000; Puupponen *et al.* 2001; Manach *et al.* 2005).

Fenolik bileşiklerin tüketiminin sağlığa yararlı olduğu belirtilmiştir (Hertog *et al.* 1993; Parr and Bolwell 2000). Bu yararlı etkinin fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinden dolayı olduğu düşünülmektedir (Heim *et al.* 2002). Fenolik bileşikler gıdaların antioksidan potansiyellerinin önemli bir belirleyicisi olabilir (Parr and Bolwell 2000).

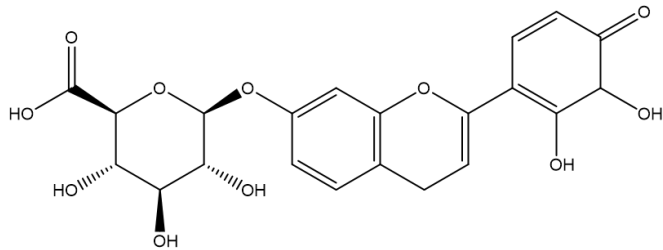
Yapısal olarak, fenolik bileşikler, aromatik halka ihtiva eden, bir ya da daha fazla hidroksil grubu taşıyan polimerize bileşiklerdir (Bravo 1998). Yapısal farklılıklarına rağmen, bu bileşikler genellikle ‘polifenoller’ olarak adlandırılır. En çok doğal olarak meydana gelen fenolik bileşikler, mono- ve polisakaritlerin bir ya da daha fazla fenolik grup ile oluşturduğu konjugatlardır (Shahidi and Nacz 1995; Harborne *et al.* 1999). Bu yapısal farklılık, fenolik bileşiklerin doğada geniş bir yelpazede bulunmasını sağlar, fenolik bileşikler Çizelge 1.2’de gösterildiği gibi kategorize edilebilir.

Çizelge 1.2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Flavonoidler ve fenolik asitler polifenollerin en büyük sınıfıdır (Dewick 2009). Bu sınıflardan fitokimyasalların hem *in vitro* hem de *in vivo* araştırmalarda mükemmel antioksidan olduğu tespit edilmiştir (Croft 1998). Bitki polifenollerinin antioksidan potansiyeli elektron verme, indirgeme gücü, metal iyon şelatlama kabiliyeti ile bağlantılıdır (Rice-Evans 1997).

1.6. Çalışmada Kullanılan Flavonoidler

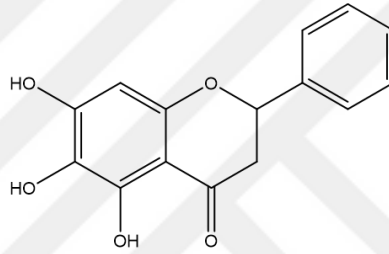
1.6.1. Baicalin



Çin’de tıbbi öneme sahip bir bitki olarak kullanılan *Scutellaria baicalensis*’den izole edilen baicalin (baicalein 7-O-β-D-glukuronik asit) flavon yapısındadır. *Scutellaria*

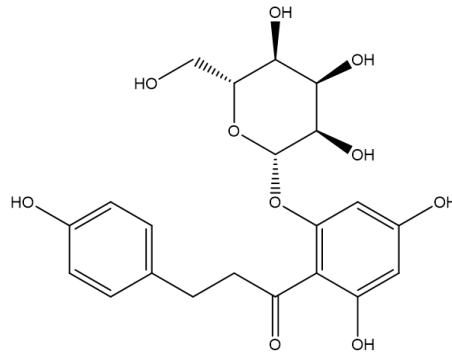
baicalensi bitkisinde elliden fazla flavonoid tanımlanmıştır. Bunun önemli bir yüzdesini baicalin ve baicalinin aglikon yapısı olan baicalein oluşturur. Baicalin *Scutellaria baicalensi* bitkisinin köklerinde bol bulunduğu ve düşük toksisiteli olduğundan son yıllarda çalışmalarda kullanılan önemli bir bileşik olmuştur. Baicalin ve baicaleinin hematolojik tümör türlerinde antikanser rol oynadıkları çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır (Kumagai *et al.* 2007; Li-Weber 2009; Gasiorowski *et al.* 2011; Zhang Li *et al.* 2011).

1.6.2. Baicalein



Baicalein (5,6,7-trihidroksiflavon) *Scutellaria baicalensis* bitkisinin major flavonoidlerindendir ve baicalinin glukoz birimi içermeyen yani aglikon yapısıdır (Kumagai *et al.* 2007; Chen *et al.* 2014).

1.6.3. Phloridzin



Phloridzin flavonoidlerin kalkon alt sınıfına aittir ve en çok elmada bulunur. Phloridzin ve türevleri diyabet, obezite, hiperglisemi gibi hastalıkların yanı sıra gıda katkı maddesi

olarak kullanımı, antioksidan özellikleri, kozmetik ve farmakolojik uygulamaları gibi bir çok alanda araştırma konusu olmuştur (Sukhorukov *et al.* 2001; Valenta *et al.* 2001; Rezk *et al.* 2002; Ehrenkranz *et al.* 2005)

1.7. Glutasyon S-transferaz

50 yılı aşkın bir süredir kemoterapi metastatik kanser tedavisinde değişen başarı oranları ile kullanılmaktadır. Birçok kemoterapötik ajanların kullanımında büyük problem; onların normal hücre ve organlara zararları, dar bir terapötik indekse sahip olmaları, neoplastik hücreler için nispeten zayıf bir seçicilik, uzun süreli tedaviden sonra ilaca direnç, artan glutasyon transferaz (GST; EC 2.5.1.18) ekspresyonu ve gelişmiş DNA tamiridir (Lowenthal and Eaton 1996; Nielsen *et al.* 1996; Stavrovskaya 2000; Arpicco *et al.* 2011). Bu problemleri aşmak için potansiyel strateji ön ilaçların kullanımındır. Ön ilaç dizaynı için daha akılcı bir yaklaşım hücre transformasyonu için sorumlu moleküler hedeflere dayanır. Ön ilaçlar iki gruba ayrılabilir (1) anti-tümör ajanların farmakokinetik ve biyolojik olarak yararlanımlarını arttırmak için tasarlanan moleküller ve (2) lokal olarak etkili olacak şekilde tasarlanmış anti-tümör ajanları (Ruzza and Calderan 2013).

1.7.1. Glutasyon ve glutasyon transferaz

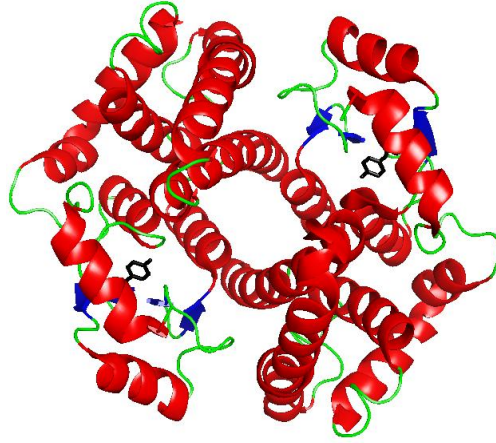
Glutasyon (γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin, GSH) hayvansal dokularda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yüksek hücresel düzeylerde (0.1-10 mm) yaygın olarak bulunur. Birçok hücrede GSH toplam protein yapısında olmayan sülfür gruplarının %90 fazlasını oluşturmaktadır. GSH (γ -Glu bağlantı ve SH grubu) hücre içi stabilizasyonu sağlamak, protein ve nükleik asit sentezini içeren reaksiyonlara katılmak ve serbest radikalleri ve peroksitleri detoksifiye etmek gibi önemli fonksiyonlara sahiptir.

GST'ler elektrofillerle GSH tripeptidinin konjugasyonunu katalize eden dimerik protein ailesidir (Şekil 1.7) (Commandeur *et al.* 1995; van Bladeren 2000; Hayes *et al.* 2005). Bu proteinler, hemen hemen tüm türlerde bulunur ve dizi benzerliği temel alınarak

sınıflara ayrılırlar. Memelilerde sitozolik GST'ler Alfa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Teta ve Zeta olarak sınıflandırılmaktadır (Mannervik *et al.* 2005). Teta ve Zeta sınıfı GST'ler bitkilerde ve diğer organizmalarda da tanımlanmıştır. Diğer gruplar sadece böceklerde tespit edilen Delta ve Epsilon (Ranson *et al.* 2001), bitkilerde Lambda (Dixon *et al.* 2002), Phi, Tau ve prokaryotlarda Betadır (Rossjohn *et al.* 1998). Mitokondriyal GST'lerin Kappa sınıfı "eikozanoid ve glutatyon metabolizması dâhil membran bağımlı protein "(MAPEG) olarak adlandırılan proteinlerdir. Mikrozomal ve mitokondriyal olan bu sınıfın GSH ile konjugasyon aktivitesi diğer sınıflarla benzer olmasına rağmen yapısal olarak farklıdır (Mannervik *et al.* 2005).

Memelilerde, GST'ler, hemen hemen tüm dokularda mevcuttur. Sıçanlarda, sitozolik ve membrana bağlı GST aktiviteleri karaciğerde yüksek seviyelerde bulunmuştur (Depierre and Morgenstern 1983). İnsanlarda, en yüksek sitozolik GST aktivitesi seviyesi karaciğerdedir. Böbrek (karaciğerin %78'i), akciğer (karaciğerin %34'ü) ve barsakta (karaciğerin %37'si) daha düşük aktivite düzeyleri gözlenmiştir (Pacifci *et al.* 1988).

GST'lerin çeşitli sınıflarının üç boyutlu yapıları X-ray kristallografisi ile aydınlatılmıştır. İnsan GSTP1-1 kuaterner yapısı, Şekil 1.7'de gösterilmiştir. Şekilde siyahla gösterilen tirozin kalıntılarının glutatyon aktivasyonunda (GSH) rol aldığı önerilmektedir. Her GST alt birimi bir N-terminal ve C-terminal kısımlarından oluşmaktadır. Bir α -sarmal yapısı içeren kısımda GSH-bağlanma bölgesi (G-alanı) ve bağlanma bölgesinin büyük bir kısmını oluşturan hidrofobik elektrofillerin bağlandığı kısım (H-site) bulunur. N-terminal kısmı farklı GST sınıflarının oluşmasında etkilidir. H alanının hidrofobik amino asit kalıntılarının çeşitliliği substrat spesifikliğini etkiler (Armstrong 1997).



Şekil 1.7. İnsan GSTP1-1 kristalografik yapısı

GST'lerin G alanında bulunan tirozin ve serin kalıntıları enzime bağlı GSH'ın sülfhidril grubu ile hidrojen bağı yapabilme mesafesinde lokalize olmuştur. Tirozin GSH'ın tiyol grubundan proton alabilen bir baz gibi davranarak aktiviteyi sağlamaktadır. Tirozin, bir fenilalanin ile yer değiştirdiğinde, katalitik aktivite azalmaktadır (Board *et al.* 1991; Chelvanayagam *et al.* 1996).

Pi sınıfı GST'ler kolon, akciğer, böbrek, yumurtalık, pankreas, yemek borusu, mide kanserleri dâhil olmak üzere, sıçan ve insan tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır (Castro *et al.* 1987; Hayes and Pulford 1995; O'Brien and Tew 1996). Meme ve böbrek kanserinde aşırı eksprese olan pi sınıfı GST'ler bu hastalıklarda prognostik (belirteç) faktör olarak kullanılabilir. GST'lerin bazı hastalıklara karşı hücreleri koruyan detoks aktivitesi olmasına rağmen, kanser hücrelerine karşı bazı kemoterapötik ilaçların etkinliğini azaltır. GST'lerin substratı olan elektrofilik bileşik sınıfına ait bazı alkilleme ajanları antineoplastik tedavide kullanılır (Batist *et al.* 1986; O'Brien and Tew 1996). Tümörlü hücrelerde toplam GST aktivitesi ekspresyonunda bir artış olabilir ve bunun sonucunda tümör hücrelerinde multi-drug direnci olarakta isimlendirilen kemoterapötik direnç ortaya çıkar (Kodera *et al.* 1994; Sargent *et al.* 1999).

Sonuç olarak, GST inhibitörlerinin geliştirilmesi antitümör ilaçların etkinliğini artırmak ve multi-drug direncinin üstesinden gelmek için önemlidir. GST inhibitörlerinde

ilerlemeleri özetleyen derleme yayınlar son zamanlarda ilgi çekmektedir (Ruzza *et al.* 2009). Öte yandan, tümörlü hücrelerde bazı GST enzimlerinin artan ekspresyonu, kanser tedavisinde pro-drug kullanımı ile ekspresyonunun azaltılması enzimi hedef haline getirmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüze kadar farklı kaynaklarda antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla propofol (Gulcin *et al.* 2005), dantrolen (Gulcin *et al.* 2001), serotonin (Gulcin 2008), morfin (Gulcin *et al.* 2004), kafeik asit (Gulcin 2006), L-karnitin (Gulcin 2006), L-Adrenalin (Gulcin 2009), L-Tirozin ve L-Dopa (Gulcin 2007), dimerik yapıda bazı fenol bileşikleri (Gulcin and Dastan 2007), kurkumin (Ak and Gulcin 2008), rezveratrol (Gulcin 2010) gibi biyolojik açıdan önemli moleküllerin antioksidan kapasiteleri araştırılmış ve bu maddelerin bazıları için muhtemel mekanizmalar öne sürülmüştür. Belirlenen aktiviteler standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile mukayese edilmiştir.

Antioksidan aktivite üzerine kimyasal yapının etkisini araştırıldığı bir çalışmada *in vitro* koşullarda insan LDL'sinin bakır katalizli oksidasyonunun katekin, kuersetin, siyanidin, kafeik asit ve elajik asit tarafından inhibisyonunu incelemişlerdir. Bu beş bitkisel fenolik madde benzer ortodihidroksi yapıya sahiptir. Antioksidan aktivitenin katekin > siyanidin~ kafeik asit > kuersetin > elajik asit sırasını takip ettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu fenolik bileşikler arasındaki sinerjik ya da antagonist etkilerin incelenebilmesi için bileşiklerden ikisi veya üçü karıştırılarak 20 farklı kompozisyonda örnekler hazırlanmış ve analizlenmiştir. Tüm karışımlar antioksidan aktivitede artış gösterirken sadece elajik asit- katekin karışımı elajik asitteki karbonil grupları arasındaki H-bağları ve katekindeki orto-hidroksil grupları nedeniyle antagonist etki yaratmıştır (Meyer *et al.* 1998).

Flavonoid antioksidanların yapı-aktivite ilişkileri incelendiği çalışmada orto-konumundaki hidroksil bulunduran flavonoidlerin serbest oksijen radikallerini süpürme etkilerinin meta-konumunda hidroksil bulunduran flavonoidlerden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Orto-hidroksi yapıları molekül içi hidrojen bağları ile kararlı hale gelebilmektedir. Ayrıca C halkasının B halkasını çok az etkilediği ve çoğu flavonoidde B halkasındaki orto-konumunda bulunan hidroksil gruplarının serbest oksijen radikallerini süpürme aktivitesinde daha etkili olduğu savunulmaktadır (Hongyu 1999).

Kuersetin, mirisetin ve kaempferolün molekül yapıları ile TEAC yöntemi uygulanarak belirlenen antioksidan kapasite ilişkilerini karşılaştırıldığı çalışmada, bu bileşiklerin, yapılarında farklı sayıda hidroksil grubu bulundurdıkları görülmüştür. Kuersetin, mirisetin, ve kaempferol için elde edilen TEAC değerleri sırasıyla 4,7; 3,10 ve 1,34'tür. Mirisetinden daha az sayıda hidroksil grubu içeren kuersetinin TEAC değerinin mirisetinden daha yüksek bulunması, hidroksil grubu arttıkça antioksidan kapasitenin artması gerektiği düşüncesinin her zaman geçerli bir durum olmadığını göstermiştir. Bu farklılığın nedeninin büyük olasılıkla hidroksil gruplarının sayısı yanında konumlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lien *et al.* 1999).

42 tane flavonoid antioksidan ve antiradikal aktivitelerini araştırıldığı çalışmada β -karoten ve linoleik asitin ısı ile uyarılan oksidasyonu ve DPPH radikal giderme aktiviteleri ölçülmüştür. Flavonoidlerin yapısal olarak farklı yedi grubundan yalnızca flavonolların C-3 pozisyonundaki hidroksil grubu nedeniyle β -karoten oksidasyonunu yüksek derecede inhibe ettikleri belirlenmiştir. Antiradikal aktivitenin ise flavanol yapısına veya C-4 pozisyonunda bulunan serbest hidroksil grubuna bağlı olduğu belirtilmiştir (Burda and Oleszek 2001).

Askorbik asit ve gallik asidin antioksidan özelliklerini araştırıldığı çalışmada her iki bileşiğin indirgeme gücünün artan derişimle arttığı bulunmuştur. Her iki bileşiğinde demir(II) katyonunu şelatlama özelliği göstermediği belirtilmiştir. 4,17 mM derişimde askorbik asidin ve gallik asidin DPPH radikalini sırasıyla %42,1 ve %43,9 oranında giderdiği görülmüştür (Yen *et al.* 2002).

Çin'de bulunan 112 adet medikal bitkinin antioksidan aktivitesini ABTS radikal giderme ve troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) metodlarını kullanarak incelemişlerdir. Bitkilerin metanol ekstraktının TEAC değerleri 46.7'den 17,323 μ mol'e kadar değişen aralıkta bulunmuştur. Bileşiklerin fenolik bileşik içeriği de analiz edilmiş ve fenolik asitler, flavonoidler, tannin, kumarin, lignan, kinon, stilben ve kurkumin yapısında fenolik bileşikler tespit edilmiştir (Cai *et al.* 2004).

Bir derlemede antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin ve oto-oksidasyon inhibisyonunun kimyasal temelini incelemişlerdir. Bu tayin yöntemleri iki gruba ayrılmıştır: birincisi hidrojen atomu transferi (HAT) temeline dayanan reaksiyonlar, ikincisi electron transferi (ET) temeline dayanan reaksiyonlar. HAT temelli yöntemde antioksidan ve oksidan bileşik azo bileşiklerinin dekompozisyonu sonucu oluşan peroksil radikalleri için birbirleriyle yarışmaktadır. Düşük yoğunluklu lipoprotein oto-oksidasyon inhibisyonu, oksijen radikal absorblama kapasitesi (ORAC), toplam radikal yakalama antioksidan metodu (TRAP) HAT temelli reaksiyonlara örnek verilmiştir. ET temelli yöntemlerde ise oksidan madde, antioksidan bileşik tarafından indirgenmekte ve meydana gelen renk değişiminin ölçülmesi ile antioksidan kapasite belirlenmektedir. Antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesinde en az iki yöntemin uygulanması gerektiği belirlenmiştir (Huang *et al.* 2005).

Tarımsal ürünlere değer kazandırmanın, fonksiyonel özellik ya da antioksidan bakımından zengin gıdalar geliştirmekle mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Bu işlem antioksidanın bol bulunduğu kaynaklardan ekstraksiyonu ve gıdaya ilave edilmeden önce *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test edilmesini gerektirmektedir. *In vivo* koşullarda yapılan testler büyük maliyet getirdiği için genellikle *in vitro* koşullarda yapılan testler tercih edilmektedir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için tek bir test uygulamak antioksidan aktiviteyi doğru bir biçimde yansıtmayacaktır. Bu nedenle antioksidan bileşiğin indirgeme yeteneğini ölçen ET yöntemleri ya da hidrojen atomu transfer yeteneğini ölçen HAT yöntemlerinin temel alındığı en az iki yöntem kullanılarak antioksidan aktivite belirlenmelidir (MacDonald-Wicks *et al.* 2006).

Polifenolik bileşiklerin DPPH radikalini süpürme etkinliklerini incelediği çalışmada yapılarındaki hidroksil grubu sayısına bağlı olarak en yüksek değerlere flavan-3-ollerde rastlanmıştır. Gallik aside benzer bileşiklerin DPPH radikalini büyük ölçüde süpürdükleri belirtilmiştir. Gallik asit, kafeik asit, epikatekin, kaempferol, kuersetin, mirisetin, rutin ve askorbik asit için IC₅₀ değerleri sırasıyla 5,1; 12,1;4,5; 18,8; 5,5; 3,6; 5,3 ve 11,8 bulunmuştur (Villano *et al.* 2007).

Fenolik bileşiklerin tek başlarına veya bir arada bulunmalarına göre antioksidan aktivitede görülen değişiklikleri farklı kombinasyonlarda karışımları kullanarak TEAC ve ABTS radikal giderme yöntem ile incelemiştir. Bu amaçla sebze ve meyvelerde bulunan kateşin, klorojenik asit, siyanidin, siyanidin 3-glukozid, siyanidin 3-rutinosid, epikateşin, peonidin, peonidin 3- glukozid, kuersetin, kuersetin 3- glukozid, kuersetin 3-galaktosid ve quercetin 3-rutinosid bileşikleri kullanılmıştır. Bu fenolik bileşiklerin tek başlarına daha karakteristik aktivite gösterdikleri fakat farklı bileşimlerde bir araya getirildiklerinde sinerjistik bir etki oluşturmadıkları görülmüştür (Heo *et al.* 2007).

Mirisetin hücreyi oksidatif strese karşı koruma gücü ölçülmüş ve DPPH radikalini 5 µg/ml derişimde %21; 10 µg/ml derişimde ise %54 oranında süpürdüğünü belirlemiştir. Ayrıca mirisetinin H₂O₂ muamelesi ile azalan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesini ve protein ekspresyonunu onardığı tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2010).

Toz haline getirilmiş *Larix gmelini* (Rupr.)'den taksifolini enzim inkübasyon-su ekstraksiyon (EI-WE) metodu ile ekstrakte ederek antioksidan aktivitesini DPPH metodu ile incelemiştir. Çalışma sonucunda 1 g taksifolinin 3,84 g askorbik asite karşılık geldiğini ve askorbik asitten yaklaşık dört kat daha fazla radikal süpürücü aktivitesi olduğunu görmüşlerdir (Wang *et al.* 2011).

İnsan eritrositlerinden yapılan bir çalışmada GST enzimi glutatyon agaroz afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 16,00 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, %80 verimle ve 1143 kat saflaştırılmıştır. Daha sonra enzim aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkilerine bakılmıştır. Paclitaxel için IC₅₀ değeri 0,23 mM, cyclophosphamide için 5,75 mM, gemciabine için 6,35 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu ilaçların GST enziminin doğal substratı olan GSH ile yapılan inhibisyon çalışmalarından K_i sabitleri sırasıyla paclitaxel için 0,182±0,028 mM, cyclophosphamide için 6,97±0,49 mM, gemciabine için 6,71 mM olarak bulunmuştur (Erat and Sakiroglu 2013).

Çelik vd (2003) plasental glutatyon S-transferaz (GST- π) enzimi zamanında doğum yapmış hastanın plasentasından alınarak glutatyon-agaroz affinite kolonu kullanılarak 2.628 EÜ/mg spesifik aktivite ve %0,5 verimle 16 kat saflaştırılmıştır. Enzimin substratı olan GSH için K_M sabiti 2 mM, V_{max} değeri 11,1 EÜ/mg; CDNB için K_M sabiti 0,55 mM, V_{max} değeri 35 EÜ/mg olarak bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine ilaçların etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda antibakteriyel bir ilaç olan ampisilinin, enzim aktivitesini *in vitro* olarak %50-55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Marler *et al.* (2010) sentezlemiş oldukları 14-klorometil-12H-5,11 adiazadibenzo[b,h]florene-11-on ve 2,4-dibromo-1-hidroksifenazın bileşiklerini karaciğer hücre kültürüne uygulayarak kinon oksidoredüktaz 1, glutatyon S-transferaz ve GSH seviyelerinin değişimini incelemişlerdir. Ancak enzim aktivitelerinde ve GSH seviyesinde önemli bir artış gözlemleyememişlerdir (Marler *et al.* 2010).

HepG2 karaciğer hücrelerine kurutulmuş, dondurulmuş ve taze zencefilin metanol ekstraktı ile 12 ve 24 saat boyunca muamele etmişler. Muamele sonucu antioksidatif enzimler glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz enzim aktiviteleri ve glutatyon seviyeleri incelenmiştir. Enzim aktiviteleri ve GSH seviyesi 24 saat muamele sonucunda 12 saate kıyasla daha yüksek etki gösterdikleri bulunmuştur (Offei-Okyne 2015) .

Başka bir çalışmada, şifalı bir bitki olan *Thonningia sanguinea*'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA), *in vitro* olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir (Gyamfi *et al.* 2004).

3-arilkumarin türevlerini sentezledikleri çalışmada bu türevlerin insan plasentasından elde edilen GST enzimi üzerine inhibitör etkisini incelemişlerdir. İncelenen bileşikler arasında 6,7-dihidroksi sübstitüe kumarinlerin en yüksek inhibisyon etkisi gösterdikleri ($IC_{50}=13,5-23,83$) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 6,7-dihidroksi-3-

arilkumarinlerin potansiyel GST inhibitörü olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Alparslan and Danis 2015).

İnsan eritrositlerinden elde edilen GST enzimi üzerine hiperisin etkisini incelemişlerdir. Enzim eritrositlerden %71 verimle 2250 kat saflaştırılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi 51 EÜ/mg protein olarak bulunmuştur. Hiperisinin inhibisyon etkisi enzimin substratları olan GSH ve CDNB için incelenmiş ve inhibisyon türü yarışmasız olarak tespit edilmiştir. K_i değerleri ise GSH için 0,19 μ M, CDNB için 0,26 μ M bulunmuştur (Turk *et al.* 2015).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonikasit) (ABTS), N,N-dimetil-p fenilendiamin (DMPD), metiyonin, neokuprin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali, 3-(2-piridil)- 5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin), α - tokoferol, aseton ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, (Sternheim Germany)'dan satın alındı. Çalışmada kullanılan indirgenmiş glutatyon (GSH), Glutatyon Agaroz Sigma Chemical Company'den; sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetil aminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbitat, akrilamit, N,N'-metilen bisakrilamit, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den alınmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman coulter
pH metre	: Thermo Orion Star A211
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı(Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturuu (1x10), sigma (ABD)

Otomatik pipet	: Eppendorf
Magnetik karıştırıcı	: WiseStir MSH-20A
Saf su cihazı	: ISOLAB
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	: Siemens
Derindondurucu(-20°C'ye kadar)	: Sanyo Madical Freezer
Derindondurucu(-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

3.1.3.a. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

- 1. 0,2 M pH:6,6 fosfat tamponunun hazırlanması:** 6,24 g Na_2HPO_4 yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim 200 ml'ye tamamlandı.
- 2. %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisinin hazırlanması:** 1,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ destile suda çözüldü ve toplam miktar 150 g olacak şekilde destile su eklendi.
- 3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması:** 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam miktar 150 g olacak şekilde destile su eklendi.
- 4. %0,1'lik FeCl_3 çözeltisinin hazırlanması:** 165 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ destile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

- 1. 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisinin hazırlanması:** 47 mg CuCl_2 alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

2. $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözöldü.

3. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH:6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 ml saf suda cözöldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.c. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili cözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH' cözeltisinin hazırlanması: 39 mg 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil tamamen cözünönceye kadar bir gece boyunca 100 ml etanolda karıştırıldı.

3.1.3.d. ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili cözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,4): 2,84 g Na_2HPO_4 180 ml destile suda cözöldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

2. 2 mM'lık ABTS^{•+} cözeltisinin hazırlanması: 11 mg ABTS, 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan 100 ml fosfat tamponunda tamamen cözünönceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı.

3. 2,45 mM'lık potasyum persölfat cözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan 100 ml fosfat tamponunda tamamen cözünönceye kadar karıştırıldı.

3.1.3.d. FRAP indirgeme metodu ile ilgili cözeltiler

1. 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması: 2,46 g NaCH_3COO alındı ve 80 ml destile suda cözöldü. pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 40 mM'lık HCl Cözeltisinin Hazırlanması: 0,334 ml %37 lik HCl cözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

3. 10 mM’lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,312 g TPTZ alındı ve 100 ml 40 mM’lık HCl içerisinde çözöldü.

4. 20 mM’lık FeCl₃ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,54 g FeCl₃.6H₂O alındı ve 100 ml destile suda çözöldü.

5. FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 10 hacim 0,3M’lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM’lık TPTZ ve 1 hacim 20mM’lık FeCl₃.6H₂O çözeltisinden oluşur.

3.1.3.e. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçömlerinde kullanılan çözeltiler

Aktivite ölçöümünde kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M KH₂PO₄ (pH:6,5): 0,68 g KH₂PO₄ ve 0,014 g EDTA tartılarak 30 ml saf su içerisinde çözöldü ve pH 6,5’a ayarlandı. Son hacim destile 50 ml olacak şekilde saf su tamamlandı.
2. 20 mM GSH Çözeltisi: 0,03 g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözöldü ve hacim destile su ile 5 ml’ye tamamlandı.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,025 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95’lik etanol çözeltisi içerisinde çözöldü ve hacmi etanol ile 5 ml’ye tamamlandı.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 10 mM KH₂PO₄ ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) (Kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan çözelti): 0,68 g KH₂PO₄ ve 4,38 g NaCl alınarak 400 ml suda çözölüp pH 7,4’e getirildikten sonra destile su ile 500 ml’ye tamamlandı.
2. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:9,5) (Afinite jeline tutunan GST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 50 mM Tris-HCl çözeltisi (pH:9,5) içerisinde katı olarak GSH çözölerek 10 mM’lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 5 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulandı.
3. 0,1 M H₃BO₃ ve 0,5 M NaCl, pH:8,5 (Borat Tamponu) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon 1): 1,545 g H₃BO₃ ve 7,31 g NaCl alınarak 200 ml

saf su da çözölüp, pH 8,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH₃COO ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Asetat Tamponu) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon 2): 2.05 g NaCH₃COO ve 7.31 g NaCl alınarak 200 ml saf su da çözölüp pH:4,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez için kullanılan çözelti

1. 1 M Tris-HCl (pH:8,8): 12,11 g Tris alınarak 80 ml suda çözölüp pH 8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH:6,8): 12,11 g Tris alınarak 80 ml suda çözölüp pH 6,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid, 34,6 ml destile su içerisinde çözölüp toplam hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. %10'luk SDS çözeltisi: 1 g sodyum dodesil sülfat 9 ml destile su içerisinde çözölüp 10 ml hazırlandı.

5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat alınarak, 9 ml destile suda çözölüp 10 ml hazırlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml suda çözölüp. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edilerek pH 8,3'e ayarlanıp son hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 6,8)'den 0,65 ml, %10'luk SDS'den 1 ml %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf su ile hacim 10 ml'ye tamamlanacaktır. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numuneye karşılık 50 µl β-merkapto etanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi: Jel de yürütölen proteinleri sabitleştirmek amacıyla %50 izopropanol, %40 su ve %10 TCA içeren bir karışım hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi çözölüp hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 40 ml su ve 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

11. %0,1'lik bromtimol mavisi çözeltisi: 0.1 gram indikatör 0.01 M 16 ml NaOH içerisinde çözülerek toplam miktar 100 g olacak şekilde destile su eklendi.

3.2. Antioksidan Çalışmaları

3.2.1. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi

Toplam indirgeme tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (1986). Bunun için öncelikle 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde deney tüplerine aktarıldı, hacim destile suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml ve 0,2 M'lık fosfat tamponu (pH:6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyumferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] ilave edilerek karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 ml %10'luk (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 ml alındı ve bunun üzerine 2,5 ml destile su ve 0,5 ml %0,1'lik FeCl_3 ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol olarak numune yerine su kullanıldı.

3.2.2. Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu)

Baicalin, baicalein ve phloridzin bileşiklerinin Cu^{+2} indirgeme aktivitesi Apak metodunun (Apak *et al.* 2006) küçük modifikasyonuyla yapıldı (Ak and Gulcin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan baicalin, baicalein, phloridzin, standart antioksidanlar ve sırasıyla 0,25 ml CuCl_2 çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi ($7,5 \times 10^{-3}\text{M}$) ve 0,25 ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tampon çözeltisi (1 M) deney tüplerine eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

3.2.3. FRAP indirgeme kapasitesi

FRAP metodunda antioksidan maddelerin asidik ortamda ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksini ($[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$) ferröz kompleksine ($[\text{Fe}^{+2}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$) indirgeme kapasitesi ölçülür (Benzie and Strain 1999). Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde fenolik bileşikler ve standart çözeltiler aktarıldı. Hacimleri 0,3 M asetat tamponu ile ($\text{pH}=3,6$) 0,5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 μl 20 mM'lık FeCl_3 çözeltisi ve 2250 μl FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 ml'ye tamamlandı. Deney tüpleri vortex'de karıştırılarak ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbanslar kaydedildi. Kör olarak asetat tamponu kullanıldı.

3.2.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme aktivitesi

DPPH $^{\bullet}$ serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (M.S. 1958). Serbest radikal olarak DPPH $^{\bullet}$ 'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltiler kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlarında stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri etanol ile 3 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH $^{\bullet}$ çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanoldan oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH $^{\bullet}$ çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH $^{\bullet}$ çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

3.2.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) serbest radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre belirlendi (Re Pellegrini *et al.* 1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık persülfat çözeltisi ilave edilerek ABTS $^{++}$ radikalleri üretildi. ABTS $^{++}$ radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı

7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ ayarlandı. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesine bakılacak olan bileşkerin farklı konsantrasyonlarına (10-30 µg/ml) birer ml ABTS^{•+} radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım saat inkübe edildi. Etanoldan oluşan köre karşı 734 nm’de absorbanslar kaydedildi.

3.3. İnsan Eritrosit GST Enziminin Saflaştırılması

3.3.1. Kan temini ve hemolizat hazırlanması

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi’nden taze olarak temin edildi. Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, santrifüje yerleştirildi ve 15 dakika 2500xg’de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti %1’lik (izotonik) NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C’de 20.000 g’de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra çökelek kısmı atıldı. Böylece hemolizat elde edilmiş oldu.

3.3.2. Afinite jelinin hazırlanması ve GST enziminin saflaştırılması

Enzimi saflaştırmada kullanmak üzere Glutasyon- Agaroz jeli 1 gram tartılarak 200 ml saf su da 2°C ile 4°C arasında bir gece şişirildi daha sonra safsızlıkları uzaklaştırmak için jelin 10 katı kadar saf suyla ya da dengeleme tamponuyla birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompuyla vakum uygulanarak alındı. Hazırlanan jel, 1x10 cm’lik kolona paketleni. Jel paketlenildikten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm de absorbanslarının veya pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu (Guvercin *et al.* 2008).

Önceden hazırlanan hemolizat dengelenen Glutasyon Agaroza afinite kolonuna uygulandı. Numune kolondan geçirildikten sonra, 280 nm’de elüsyonlardaki absorbans farkı 0,05 oluncaya kadar kolon dengeleme tamponuyla yıkandı. Daha sonra 10 mM GSH içeren 50 mM Tris/HCl (pH=7,5) tamponuyla gradientli elüsyon yapıldı ve elüatlar 1,5 ml halinde tüplere alındı ve 280 nm’de absorbans, 340 nm’de aktivitelerine bakıldı. Aktif elüsyonlar sonraki çalışmalar için birleştirildi.

3.3.3. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-15 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuca bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önleildi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jeller Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi pipetlendi. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Enzim örnekleri ve standart proteinler kuyulara dikkatli bir şekilde yüklendi. Jel plakaları elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Önce 80 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra gerilim 120 volt’a çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım

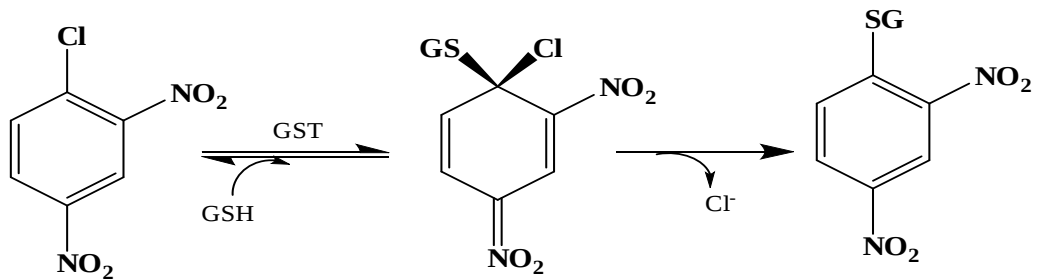
kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine koyuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.1. Elektroforez jellerinin hazırlanması

Yığıma jeli	Ayırma jeli
5 ml 1 M Tris-HCl pH:8,8	0,41 ml 1 M Tris-HCl pH:6,8
6,53 ml %30'luk akrilamid- bisakrilamid	0,8 ml %30'luk Akrilamid- bisakrilamid
0,2 ml %0,1'lik SDS	0,03 ml %0,1'lik SDS
0,13 ml %5'lik TEMED	0,03 ml %10'lik TEMED
1 ml saf su	2,45 ml saf su
0,2 ml %10'luk PER	0,07 ml %5'lik PER

3.3.4. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen 5-glutasyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbans gösterir (Şekil 3.1). Böylece bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir.



Şekil 3.1. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous *et al.* 2002)

GSH'ın yokluğunda, CDNB hızlı bir şekilde glutatyon S-transferazı inaktive eder. Bu sebepten dolayı reaksiyonun GSH ile başlatılması gerekir. Aktivite ölçümü için toplam hacim 1ml olacak şekilde Çizelge 3.2'de verilen çözelti ortamı hazırlandı. Küvetler spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig and Jakoby 1981).

Çizelge 3.2. GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür

Küvet İçeriği	Kör	Numune
0,5 M aktivite tamponu	200 µl	200 µl
25 mM CDNB	20 µl	20 µl
20 mM GSH	50 µl	50 µl
Saf su	730 µl	720 µl
Enzim numunesi	-	10 µl

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{9,6} \times \frac{V_T}{V_E} \times SF$$

EÜ: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

9,6: 340 nm'de 1 mM DNB-SG'nin ekstinksiyon katsayısı

V_T: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

V_E: Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.3.5. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine tez kapsamındaki fenolik bileşiklerin etkisinin belirlenmesi

İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine baicalin, baicalein ve phloridzin fenolik bileşiklerinin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına en az beş farklı konsantrasyonda fenolik bileşik katılarak aktivite değerleri okundu. Okunan aktivite değerleri ile %Aktivite- [İnhibitör] grafiği çizilerek IC_{50} değerleri belirlendi.

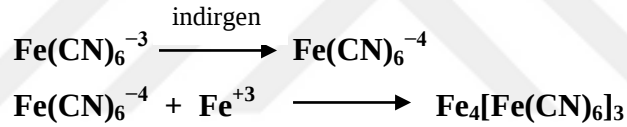
İnhibisyon gösteren fenolik bileşiklerin IC_{50} değerleri belirlendikten sonra K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan GST enzim aktivitesini yarıya düşüren fenolik bileşik konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit fenolik bileşik konsantrasyonlarında, uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $V_{max}=V_{max}^I(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

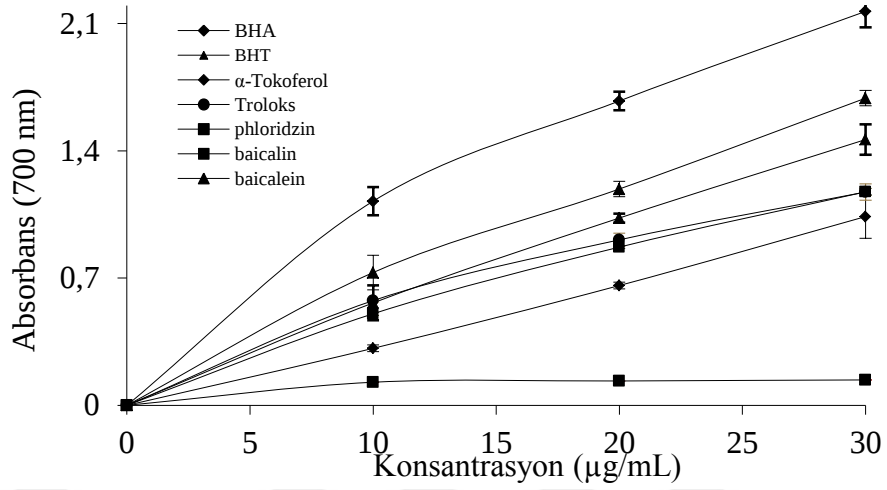
4.1. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.1.1. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kuvveti bulguları

Biyoaktif moleküllerin indirgeme gücünün ölçüldüğü bu metotta $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ 'ün $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ 'ye indirgenmesi ölçülmektedir. İndirgenme ürününün serbest Fe^{+3} ile reaksiyonu sonucu oluşan mavi renkli $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ kompleksi 700 nm'de güçlü absorbands verir (Gulcin 2006). Absorbansdaki artış indirgeme kapasitesindeki artışın göstergesidir.



Çalışmada kullanılan baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbandsları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlardan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.1) her bir standart antioksidan ve baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri için 20 µg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

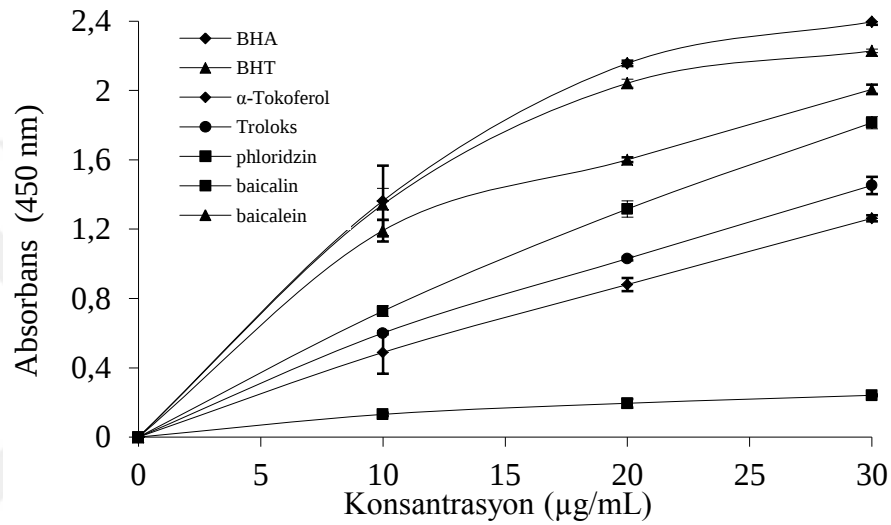
Bu konsantrasyonda baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kuvvetleri $\text{BHA} > \text{baicalein} > \text{BHT} > \text{troloks} > \text{baicalin} > \alpha\text{-tokoferol} > \text{phloridzin}$ şeklindedir.

4.1.2. Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları

Bu yöntemde kullanılan kromojenik indirgeyici ajan bis(neokuproin), bakır(II) şelatıdır. Bu reaktif pH 7,0'de kullanışlıdır. Polifenollerin oksidasyonu ile Cu(II) - neokuproin şelatı 450 nm'de maksimum absorbans veren Cu(I) -neokuproin şelatına indirgenir.

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi, artan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Baicalin,

baicalein, phloridzin maddelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.2). Daha sonra her bir standart antioksidan ve baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri için 20 $\mu\text{g/ml}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

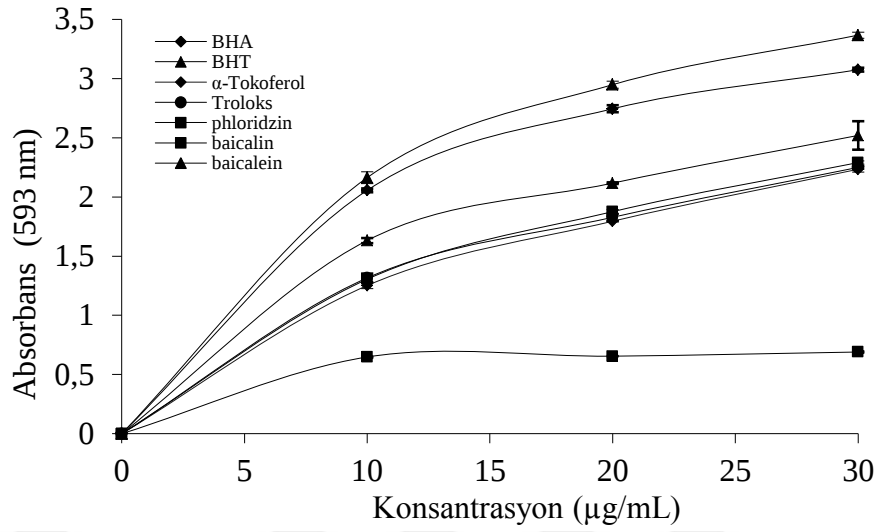


Şekil 4.2. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) kuprik iyonlarını (Cu^{+2}), kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kuvvetinin standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda baicalin, baicalein, phloridzin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme aktiviteleri $\text{BHA} > \text{baicalein} > \text{BHT} > \text{baicalin} > \text{troloks} > \alpha\text{-tokoferol} > \text{phloridzin}$ şeklinde sıralanmaktadır.

4.1.3. FRAP indirgeme kuvveti bulguları

FRAP metodunda ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksinin ($[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$) asidik ortamda koyu mavi renkli ferröz kompleksine ($[\text{Fe}^{+2}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$) indirgenmesi ölçülmektedir.



Şekil 4.3. Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksini $[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ ferröz kompleksine $[\text{Fe}^{+2}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$ indirgeme kapasitesi standart antioksidanlardan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksini $[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ ferröz kompleksine $[\text{Fe}^{+2}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$ indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 µg/ml) çözeltilerinin 593 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.3). Daha sonra her bir standart antioksidan ve baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri için 20 µg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

Bu konsantrasyonda baicalin, baicalein, phloridzin ve standart antioksidanların ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksini indirgeme aktiviteleri baicalein > BHA > BHT > baicalin > troloks > α -tokoferol > phloridzin şeklinde sıralanmaktadır.

Çizelge 4.1. 20 µg/ml konsantrasyonunda baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvveti, Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti ve FRAP indirgeme kuvveti metotlarıyla birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	$\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ İndirgeme Kuvveti	$\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$ İndirgeme Kuvveti	FRAP Metotu İndirgeme Kuvveti
BHA	1,674	2,156	2,745
BHT	1,030	1,600	2,117
α -Tokoferol	0,659	0,880	1,795
Troloks	0,910	1,030	1,828
Baicalin	0,870	1,316	1,876
Baicalein	1,190	2,042	2,949
Phloridzin	0,134	0,195	0,655

4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH radikal giderme aktivitesi antioksidan aktiviteyi belirlemek için kullanılan en eski yöntemlerdendir. DPPH^{*} (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) hidrojen atomu verebilen bileşiklerle tepkimeye girebilen kararlı bir radikaldır ve 517 nm'de maksimum absorbans oluşturmaktadır. Antioksidanlarla muamele, DPPH^{*}'ten kaynaklanan mor rengin şiddetinin azalmasına ve absorbansın düşmesine sebep olacaktır. Farklı örnek derişimleri ile muamele edilen DPPH^{*}'in absorbansındaki değişim ölçülerek derişime karşılık gelen absorbanslarla grafik çizilerek $y=ax$ denkleminde DPPH^{*} derişimini yarıya düşüren örnek miktarı µg/ml cinsinden belirlenmekte ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmektedir.

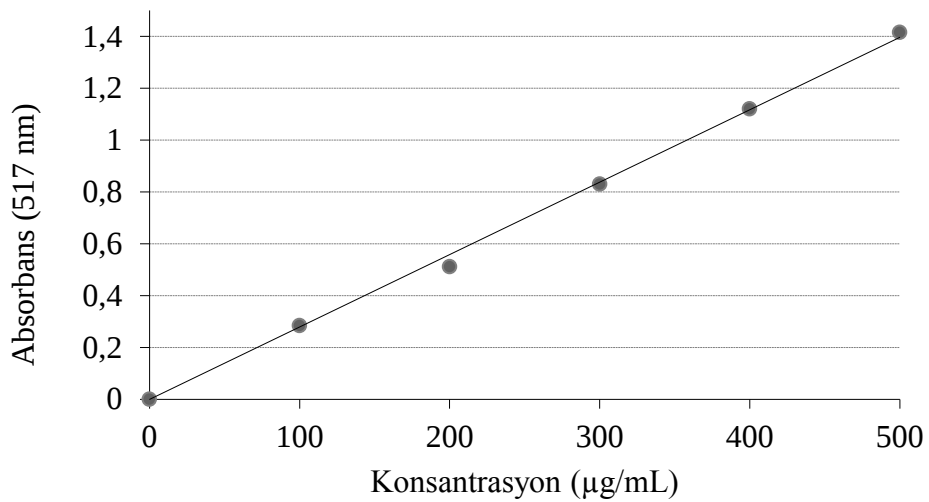
Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH^{*} serbest radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9974) (Şekil 4.4).

DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH[•] serbest radikal miktarı standart grafikten hesaplandı

DPPH[•] serbest radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

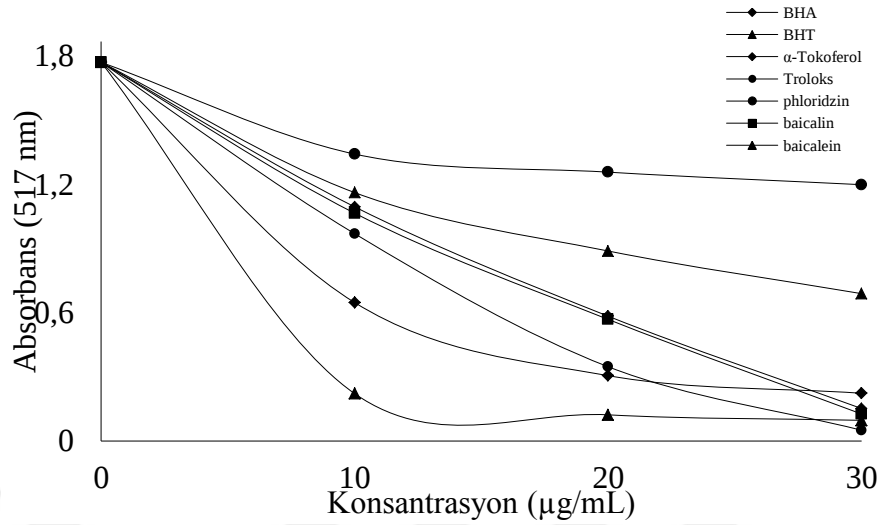
$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$

Burada λ_{517-N} DPPH[•] serbest radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, λ_{517-K} ise sadece DPPH[•] serbest radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı.



Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ve kullanılan standart antioksidanların DPPH serbest radikali giderme aktivitesi Şekil 4.5’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



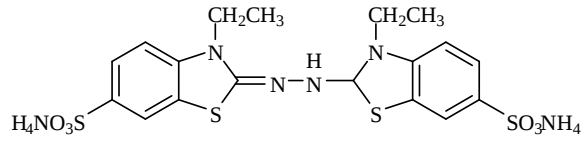
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin (10–30 µg/ml) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin DPPH[•] serbest radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra her biri için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ve kullanılan standart antioksidan molekülleri için baicalein > α-tokoferol > BHA > troloks > baicalin > BHT > phloridzin şeklinde, 30 µg/ml konsantrasyonda DPPH[•] radikali giderme aktivitesi (%) ise 94,6; 91,4; 87,4; 85,8; 77,7; 61,1; 32,3 şeklinde sıralanmaktadır.

4.1.5. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi bulguları

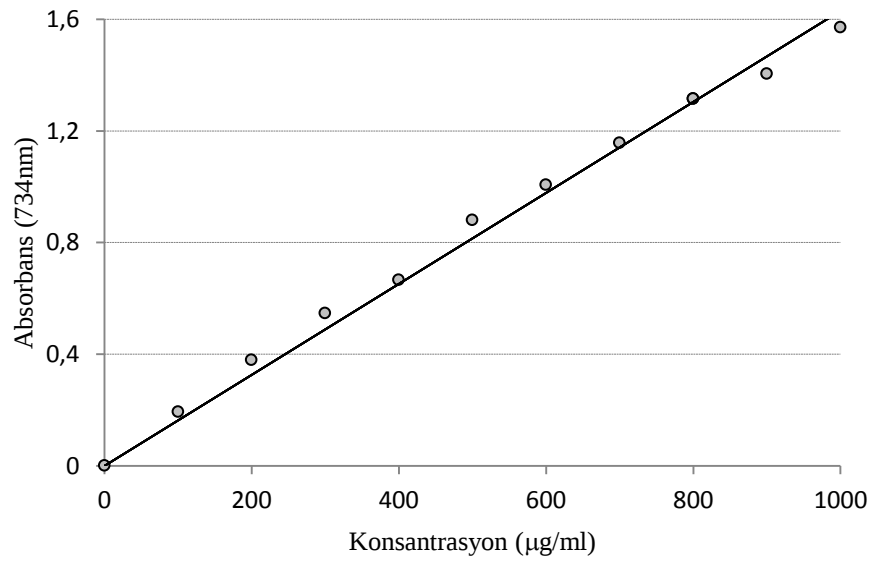
ABTS ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu mavi/yeşil ABTS^{•+} kromoforu oluşur. Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Oluşan renkli radikalik katyonun antioksidan tarafından renk giderimi ölçülür. Aşağıda molekül yapısı verilen ABTS radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır.



Şekil 4.6. ABTS'nin açık kimyasal yapısı

Metot hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilir ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemidir.

Baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri ile çalışmada kullanılan BHA, BHT, α - tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $ABTS^{++}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2:0,993$) (Şekil 4.8).



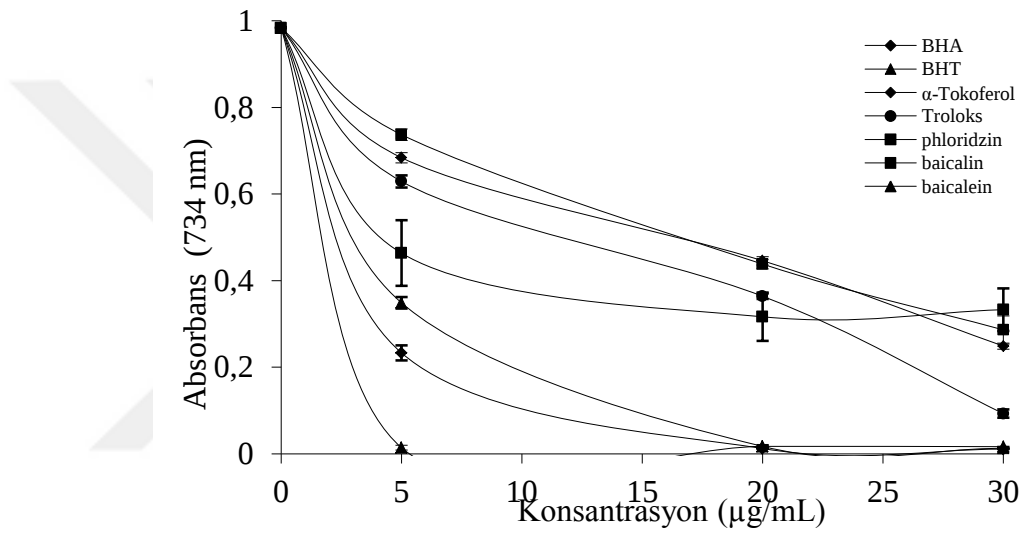
Şekil 4.7. $ABTS^{++}$ giderme aktivitesi tayininde kullanılan $ABTS^{++}$ için hazırlanan standart grafik

$ABTS^{++}$ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan $ABTS^{++}$ miktarı standart grafikten hesaplandı.

$ABTS^{++}$ giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada $\lambda_{734\text{-N}}$ ABTS^{•+} çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $\lambda_{734\text{-K}}$ ise sadece ABTS^{•+} çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin (10-30 µg/ml) ABTS^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Baicalin, baicalein, phloridzin maddelerinin ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.8) her bir standart ve Baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

Baicalin, baicalein, phloridzin maddeleri ve kullanılan standart antioksidan moleküllerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri sırasıyla BHA $\approx$ BHT $\approx$ baicalein > troloks > α -tokoferol > baicalin > phloridzin şeklindedir. 30 µg/ml konsantrasyonda ABTS radikali giderme aktivitesi (%) ise 98,9; 98,7; 98,3; 90,5; 74,7; 70,9; 66,1'dür.

Çizelge 4.2. Baicalin, baicalein, phloridzin çözeltilerinin DPPH·, ABTS⁺⁺ radikali giderme aktivitelerinin IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Antioksidanlar	DPPH· Giderme	ABTS ⁺⁺ Giderme
BHA	9,86	3,07
BHT	28,56	3,1
α-Tokoferol	8,85	14,91
Troloks	10,29	7,56
Baicalin	12,0	15,51
Baicalein	7,45	3,12
Phloridzin	42,0	17,8

4.2. Glutasyon S-transferaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.2.1. GST enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

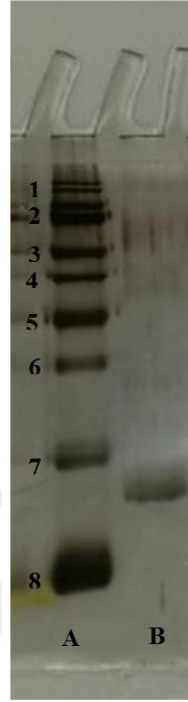
Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan hemolizat dengelenen Glutasyon Agaroza afinite kolonuna yüklendi. Kolon bölüm 3.2.3.b’de açıklandığı gibi uygun tamponla yıkandı ve gradientli elüsyon ile enzim elüe edildi. Elüatlarda aktivite ölçümü (Habig *et al.* 1974) ve kantitatif protein tayini yapıldı (Bradford). Elde edilen veriler Çizelge 4.3’de gösterildi.

Çizelge 4.3. İnsan eritrositlerinden Glutasyon Agaroza afinite kolonu ile saflaştırılan GST enziminin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	21	0,069	27,36	574,54	1,458	0,002	100	1
Glutasyon-Agaroz afinite kromatografisi	1,5	0,188	0,056	0,085	0,281	3,309	19,27	1654

4.2.2. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GST enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan GST enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı bilinen standart protein markırlar kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezine insandan saflaştırılan enzim tatbik edildi. Boyama işlemi ile belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.9).



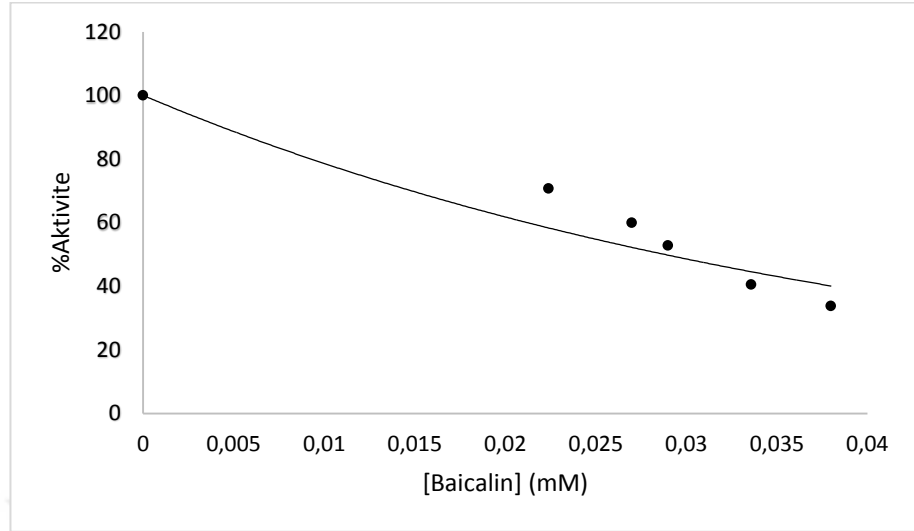
Şekil 4.9. Glutatyon-agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılan insan eritrosit GST enziminin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı

* a) Standart proteinler (1: 180 kDa, 2: 130 kDa, 3: 95 kDa, 4: 72 kDa, 5: 55 kDa, 6: 43 kDa, 7: 26 kDa, 8: 10 kDa) B) İnsan eritrosit GST enzimi

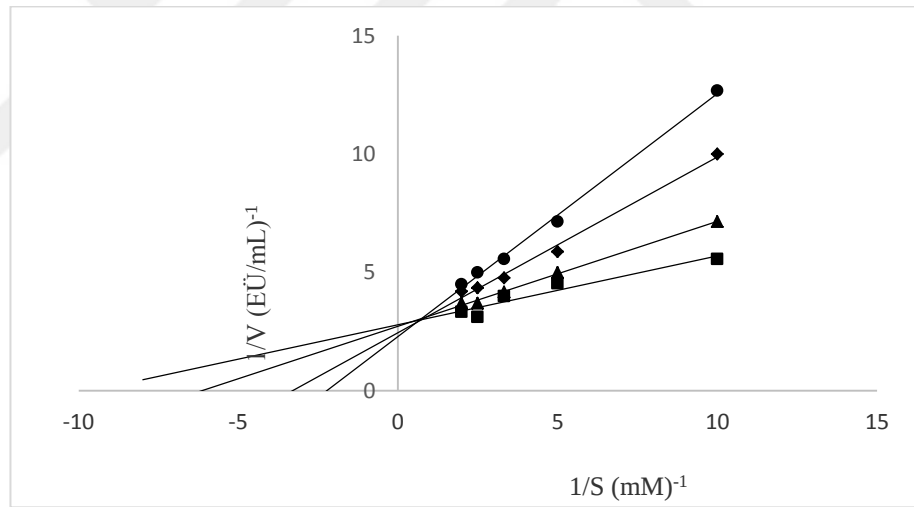
4.2.3. GST enzim aktivitesi üzerine tez kapsamındaki fenolik bileşiklerin etkisinin belirlenmesi ilgili yapılan çalışma sonuçları

4.2.3.a. Baicalin flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla önce %Aktivite- [İnhibitör] grafiği çizilerek %50 inhibisyona sebep olan baicalin konsantrasyonu olan IC_{50} değeri hesaplandı (Şekil 4.10). GST enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra, baicalin flavonoidi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak $1/V-1/S$ değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, K_i değeri hesaplandı ve inhibisyon türü belirlendi.



Şekil 4.10. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Baicalin] grafiği

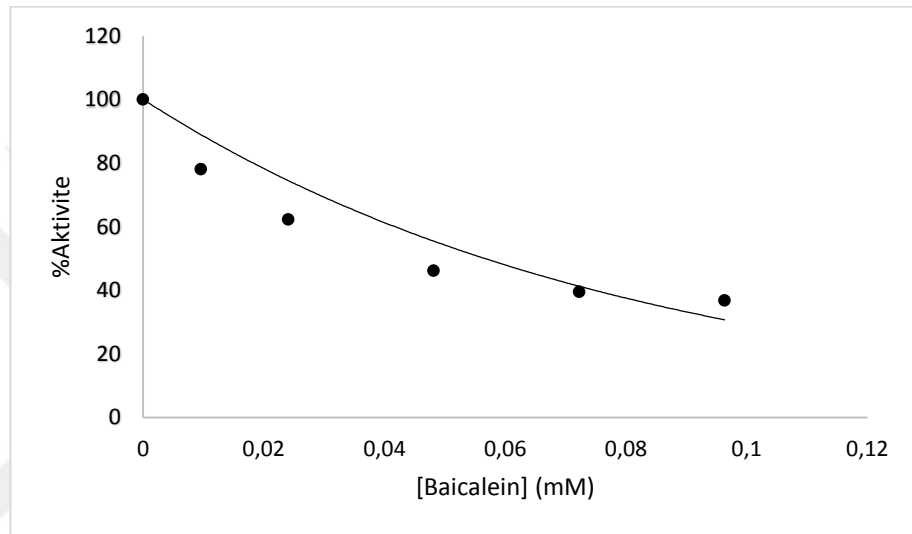


Şekil 4.11. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi

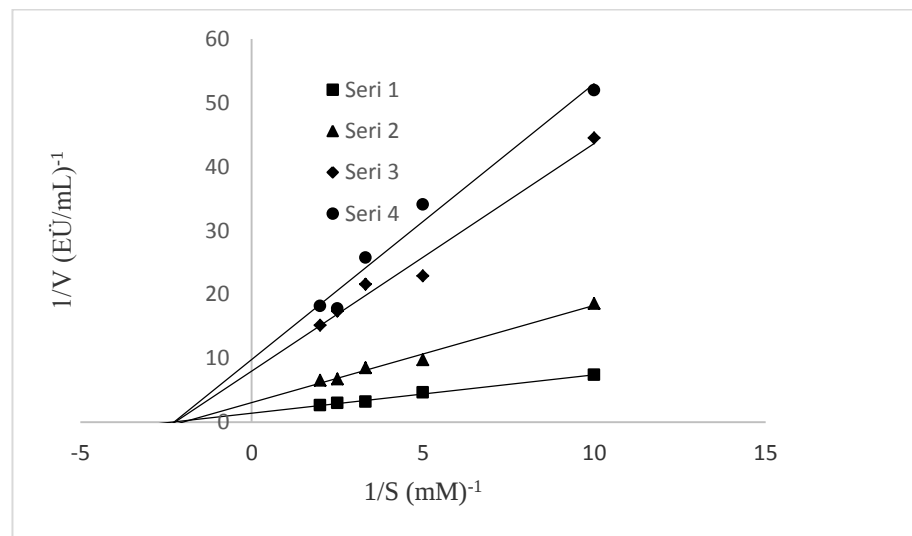
4.2.3.b. Baicalein flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine baicalein flavonoidinin inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla önce %Aktivite- [İnhibitör] grafiği çizilerek %50 inhibisyona sebep olan baicalein konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri hesaplandı.

(Şekil 4.12). GST enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra, baicalein flavonoidi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak $1/V-1/S$ değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, K_i değeri hesaplandı ve inhibisyon türü belirlendi.



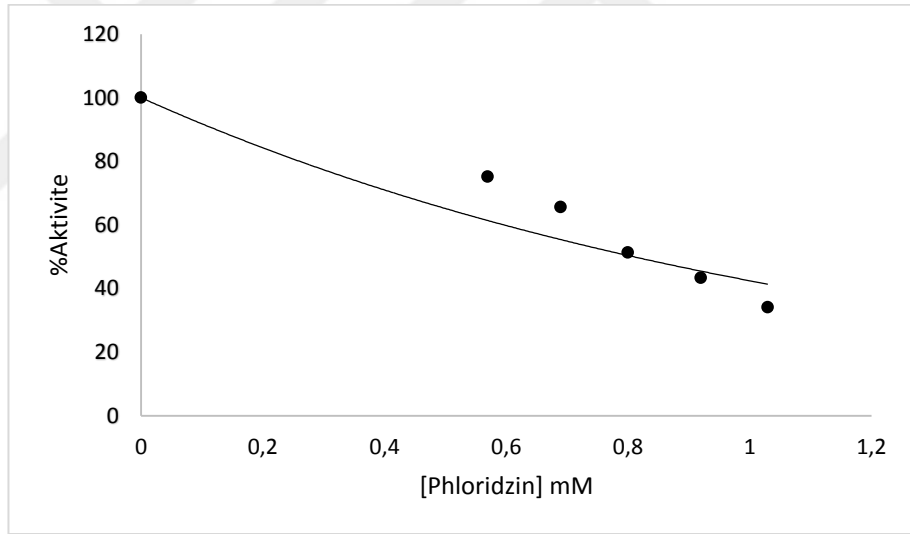
Şekil 4.12. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine baicalein flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Baicalein] grafiği



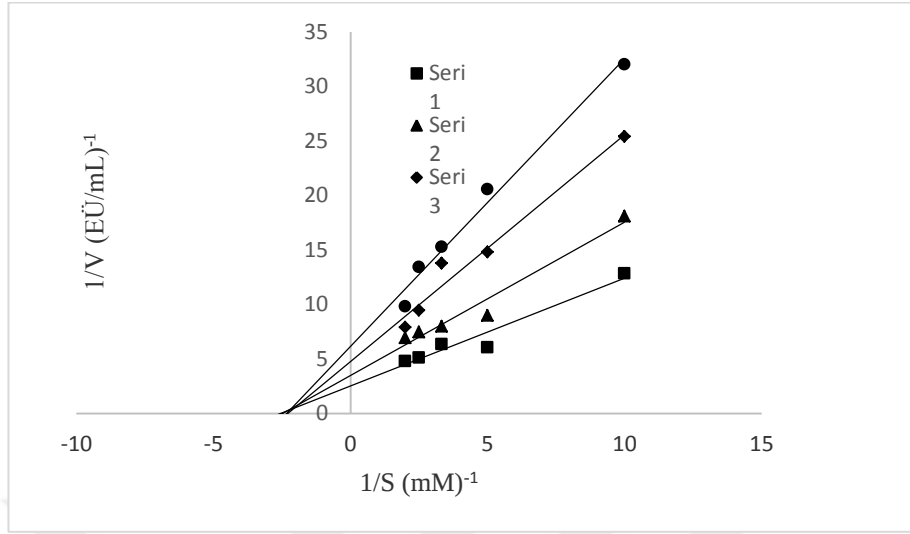
Şekil 4.13. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine baicalin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi

4.2.3.c. Phloridzin flavonoidinin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sonuçları

İnsan eritrositinden saflaştırılan GST enzim aktivitesi üzerine phloridzin flavonoidinin inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla önce %Aktivite- [İnhibitör] grafiği çizilerek %50 inhibisyona sebep olan phloridzin konsantrasyonu olan IC_{50} değeri hesaplandı. (Şekil 4.14). GST enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra, phloridzin flavonoidi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V-1/S$ değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, K_i değeri hesaplandı ve inhibisyon türü belirlendi.



Şekil 4.14. İnsan eritrosit GST enzim aktivitesi üzerine phloridzin flavonoidinin etkisini gösteren %Aktivite-[Phloridzin] grafiği



Şekil 4.15. 5 farklı GSH konsantrasyonu ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile GST enzim aktivitesi üzerine phloridzin flavonoidinin etkisinin belirlenmesi

Çizelge 4.4. GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri için hesaplanan IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türü

İnhibitör	$IC_{50}(mM)$	$K_i(mM)$	İnhibisyon türü
Baicalin	0,028	$0,0145 \pm 0,0007$	Yarışmalı
Baicalein	0,056	$0,024 \pm 0,002$	Yarışmasız
Phloridzin	0,769	$0,762 \pm 0,185$	Yarışmasız

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son zamanlarda doğal antioksidanlar yaralı etkilerinden dolayı aktif araştırma konusu olmuştur. Doğal antioksidanların sağlık açısından daha yararlı olduğu düşüncesi tüketicilerin tercihini bu yöne çekmektedir. Yeryüzünde geniş dağılım gösteren ve doğal antioksidanlar bakımından zengin olan bitkilerden bu bileşiklerin gerek besin olarak alınması gerekse ekstrakte edilerek gıda katkı maddesi ya da koruyucu olarak kullanılması gittikçe önem kazanan bir konu haline gelmiştir.

Antioksidanlar organizma veya dokuları oksidatif strese karşı korurlar. Aynı zamanda gıdalarda da oksidasyona karşı korumayı yine antioksidanlar yaparlar. Bu durum antioksidanları fizyoloji, farmakoloji, beslenme ve gıda endüstrisinde önemli bir çalışma alanı haline getirmiştir (Magalhaes, Santos *et al.* 2009). Gıda endüstrisinde antioksidanların oksidasyondan dolayı besinde meydana gelen bozunmaları önleyici etkileri vardır. Antioksidanlar oksidasyonu iki şekilde durdurabilir yada geciktirebilir. Birincisi serbest radikalleri gidererek ki bu tür bileşikler primer antioksidanlar olarak tanımlanır. Primer antioksidanlar α -tokoferoller gibi fenolik bileşiklerdir. Sekonder antioksidanlar ise metal iyonlarını bağlama, reaktif oksijen türlerini giderme, hidroperoksitleri radikal olmayan türlere dönüştürme, UV ışınlarını absorblama ve singlet oksijeni deaktif etme gibi reaksiyonları gerçekleştirirler (Gulcin *et al.* 2008).

Antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, radikal giderme, singlet oksijeni kuençleştirme gibi birçok farklı mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Gulcin 2002).

İn vitro antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan analitik metodlar vardır. Bu metodlar; Fe^{+3} - Fe^{+2} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, Kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre Fe^{+3} -TPTZ indirgeme kapasitesi, Bipiridil kullanarak ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺⁺

radikal giderme aktivitesi, DMPD^{•+} radikal giderme aktivitesi, riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan O₂^{•-} giderme aktivitesi şeklinde sıralanabilir.

Bu çalışmada baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidlerinin *in vitro* antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla Fe⁺³-Fe⁺² transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, Kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu⁺²) kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduna göre Fe⁺³-TPTZ indirgeme kapasitesi, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS radikal giderme aktivitesi metotları kullanılmış ve BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol standart antioksidanları ile karşılaştırılmıştır.

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücü elektron verme kapasitesinin göstergesidir ve antioksidan aktivitesiyle orantılıdır. Biyoaktif bileşikler antioksidan etkisiyle oksidanları indirgeyebilirler.

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme kapasitesi Fe[(CN)₆]₃'ü Fe[(CN)₆]₂'ye direkt indirgemesiyle ölçülebilir. Bu direkt indirgeme yöntemi ile baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri ile BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol standart antioksidanların indirgeme gücü ölçülmüş BHA > baicalein > BHT > troloks > baicalin > α -tokoferol > phloridzin şeklinde bir sıralama elde edilmiştir. Sonuçlar ışığında çalışma kapsamındaki doğal bileşiklerden phloridzinin çok fazla indirgeme gücü göstermediği fakat baicalin ve baicaleinin standartlara yakın bir indirgeme gücü gösterdiği söylenebilir. Yine baicalin ve baicalein doğal bileşiklerinin artan konsantrasyonla indirgeme gücünde arttığı, phloridzinde ise artan konsantrasyonla indirgeme gücünün pek değişmediği bulunmuştur.

İndirgeme gücünün ölçüldüğü bir başka metot Apak ve ekibi tarafından geliştirilen KUPRAK metotudur. Kuprak metodu, antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının (Cu⁺²) kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgenmesi esasına dayanır. Bu yöntem, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve seçicidir. İndirgeyici maddenin türü ve hidrofilikliği gözetilmeksizin farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir yöntemdir. Bir kromojenik redoks reaksiyonu olan kuprak metodu, fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7,0)

gerçekleştirilir (Gulcin 2012). Bu yöntemle baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri ile BHA, BHT, troloks ve α - tokoferol standart antioksidanların indirgeme gücü ölçülüp ve 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda antioksidan bileşiklerin verdikleri absorbans değerleri kıyaslandığında $\text{BHA} > \text{baicalein} > \text{BHT} > \text{baicalin} > \text{troloks} > \alpha\text{-tokoferol} > \text{phloridzin}$ şeklinde sıralama elde edilmiştir. Sıralamaya bakıldığında baicalin ve baicalein flavonoidlerinin standart antioksidanlara yakın hatta doğal bir antioksidan olan α -tokoferol'den daha iyi indirgeme gücü gösterdikleri söylenebilir.

Başka bir indirgenme gücünün ölçüldüğü yöntem olan FRAP metotunda ferrik 2,4,6-tripiridil-s-triazin kompleksinin ($[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$) asidik ortamda koyu mavi renkli ferröz komplekse ($[\text{Fe}^{+2}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$) indirgenmesi ölçülmektedir. Bu yöntemle yapılan ölçümlerin sonucunda baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri ile BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol standart antioksidanları arasında $\text{baicalein} > \text{BHA} > \text{BHT} > \text{baicalin} > \text{troloks} > \alpha\text{-tokoferol} > \text{phloridzin}$ şeklinde bir sıralama elde edilmiştir. Sonuçlara göre baicalein standart antioksidanlardan daha iyi bir indirgeme gücü, baicalin ise standartlara yakın bir indirgeme gücü sergilemiştir. Yine baicalin ve baicalein flavonoidlerinin indirgeme gücü artan konsantrasyonla artmış, phloridzinde ise fazla bir değişiklik gözlenmemiştir.

Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri biyolojik sistemlerdeki etkilerinin yanında gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek için antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri ve onların tespiti oldukça önemlidir.

DPPH radikal giderme metodu antioksidanların serbest radikal giderme aktivitelerini değerlendirmek için sık kullanılan bir yöntemdir. Bu metodun esası, hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. Bu redüksiyonun ardından radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşur ve bu molekül 517 nm'de herhangi bir absorbans vermemektedir. Sonuç olarak DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir (Gulcin 2002). DPPH radikali antioksidan

gibi bir proton verici substrat ile karşılaştığında, radikaller temizlenir ve absorbansta azalma gözlenir (MS 1958; Gulcin *et al.* 2009). Çalışmada kullanılan baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri ile BHA, BHT, troloks ve α - tokoferol standart antioksidanların DPPH serbest radikali giderme aktivitesi kıyaslandığında baicalein > α - tokoferol > BHA > troloks > baicalin > BHT > phloridzin sıralaması elde edilmiştir. Aynı zamanda bu bileşikler için DPPH radikalini giderme etkinliğinin bir ölçüsü olan IC_{50} değerleride Çizelge 4.2’de belirtildiği gibidir. IC_{50} değerlerine bakılarak baicaleinin, BHA ve BHT sentetik antioksidanlarından, α -tokoferol doğal antioksidanından daha iyi radikal giderici oldukları söylenebilir.

ABTS⁺ giderme metodu ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. ABTS bir oksidan tarafında okside edilerek koyu renkli ABTS^{•+} radikal katyonu oluşturulur ve test bileşiklerin ABTS^{•+} ile doğrudan reaksiyona sokulur, renkteki azalma ile antioksidan kapasitesi ölçülür. ABTS^{•+} radikal katyonu ABTS ve K₂S₂O₈ arasındaki reaksiyon sonucu oluşur ve bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin işlemi gerçekleştirilir (Gülçin 2012). ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftirler ve bir H atom transferini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferini içerir (Kaviarasan *et al.* 2007). Çalışmada kullanılan baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidleri ile BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol standart antioksidanların ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi kıyaslandığında sırasıyla BHA $\approx$ BHT $\approx$ baicalein > troloks > α -tokoferol > baicalin > phloridzin sıralaması elde edilmiştir. Aynı zamanda bu bileşikler için ABTS^{•+} radikalini giderme etkinliğinin bir ölçüsü olan IC_{50} değerleride Çizelge 4.2’de belirtildiği gibidir. IC_{50} değerlerine bakılarak baicaleinin, BHA ve BHT sentetik antioksidanları ile aynı diğerlerinden daha iyi bir radikal giderme etkisine sahip olduğu, baicalin ve phloridzinin ise α -tokoferol doğal antioksidanına yakın radikal giderici oldukları söylenebilir.

Çalışmanın ikinci kısmı baicalin, baicalein ve phloridzin flavonoidlerinin metabolik öneme sahip glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi ile ilgilidir.

GST'ler ksenobiyotik metabolizmasının ezimlerinden biridir ve geniş spektrumda substrat spesifitesine sahiptir. Bu özelliğiyle GST endojen ve eksojen kimyasallara maruz kalan organizmada savunma görevi üstlenir. GST birçok elektrofilik materyalin aktivasyon ve inaktivasyonu için gereklidir. Bu enzim toksik bileşiklerin elektrofilik bölgelerini indirgenmiş glutatyonun –SH grubuyla etkisizleştirir. Ürün olarak suda çözünen merkaptürik asit oluşur ve vücuttan idrarla atılır. GST'ler ince bağırsak, kalın bağırsak, böbrek, akciğer, kas, plesanta ve özellikle karaciğer gibi organların sitozol ve membranlarında bulunur (Hayes *et al.* 2005).

GST'lerin saflaştırılma işleminde Glutatyon-agaroz afinite kolon ligandı olan glutatyonla GST'nin afinitesinin yüksek olması nedeniyle etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Saflaştırma işleminde sadece bir kromatografi tekniğinin kullanılmış olması, saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlar sağlamaktadır. Tez kapsamında GST enzimi insan eritrositlerinden Glutatyon-agaroz afinite kolonu ile 3,309 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, 1654 kat saflaştırılmıştır. İnsan eritrositlerinde GST enzimi daha önce Erat ve Şakiroğlu (Erat and Sakiroglu 2013) tarafından Glutatyon-agaroz afinite kolonu ile 16 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, 1143 kat saflaştırılmıştır.

Marcus *et.al* insan eritrosit GST enzimini homodimer karaciğer GST enziminin farklı bir formu olarak tanımlamıştır (Marcus, Habig *et al.* 1978). Çalışmamızda enzim afinite kolonu ile saflaştırıldıktan sonra saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.9). Sonuçta literatürle uyumlu olarak homodimer yapıdaki tek bant elde edilmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 20 kDa civarında bulunmuştur.

GST'lerin bazı hastalıklara karşı hücreleri koruyan detoks aktivitesi olmasına rağmen, kanser hücrelerine karşı bazı kemoterapötik ilaçların etkinliğini azaltır. GST'ler katalitik aktivitesi ile bazı tümör türlerinde ilaçlara karşı direnç gösterirler, bu yüzden GST inhibitörleri elektrofilik kanser ilaçların etkinliğini gösterebilmesi için potansiyel bir tedavi aracıdır. Farklı GST izoenzimleri arasında, GSTP1 kanserde aşırı ekspresyonu ve tümöral ilaç direnci ilişkilendirildiğinden dolayı dikkat çekmektedir

(Hayes, Flanagan *et al.* 2005). Kırmızı kan hücrelerinde bulunan GST izoenzimlerinin %95'inden fazlasını GST-P1 izoenzimi oluşturur (Singhal *et al.* 1990).

GST enziminin inhibitörleri kanser tedavisi açısından son derece önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda kullanılan doğal flavonoidlerin GST enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Öncelikle baicalin, baicalein, phloridzin flavonoidleri için enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitor konsantrasyonu olan IC_{50} değerleri sırasıyla 0,028 mM; 0,056 mM; 0,769 mM olarak hesaplanmıştır. Daha sonra enzim inhibitor kompleksi ayrışma sabiti olan K_i değerleri ve inhibisyon türü Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla bulunmuştur. K_i değerleri baicalin için 0,0145 mM, baicalein için 0,024 mM ve phloridzin için 0,762 mM'dır. İnhibisyon türleri ise baicalin için yarışmalı, baicalein ve phloridzin için yarışmasız bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Ak, T. and I. Gulcin (2008). "Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin." *Chemico-Biological Interactions* **174**(1): 27-37.
- Alparslan, M. M. and O. Danis (2015). "In Vitro Inhibition of Human Placental Glutathione S-Transferase by 3-Arylcoumarin Derivatives." *Archiv Der Pharmazie* **348**(9): 635-642.
- Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein (1981). "Uric-Acid Provides an Antioxidant Defense in Humans against Oxidant-Caused and Radical-Caused Aging and Cancer - a Hypothesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**(11): 6858-6862.
- Apak, R., K. Guclu, B. Demirata, M. Ozyurek, S. E. Celik, B. Bektasoglu, K. I. Berker and D. Ozyurt (2007). "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay." *Molecules* **12**(7): 1496-1547.
- Apak, R., K. Guclu, M. Ozyurek and S. E. Celik (2006). "A novel total antioxidant capacity measurement for food and plasma antioxidants: CUPRAC method." *Febs Journal* **273**: 72-72.
- Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." *Chemical Research in Toxicology* **10**(1): 2-18.
- Arpicco, S., F. Dosio, B. Stella and L. Cattel (2011). "Anticancer Prodrugs: An Overview of Major Strategies and Recent Developments." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **11**(18): 2346-2381.
- Babior, B. M. (1992). "The Respiratory Burst Oxidase." *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **65**: 49-95.
- Balla, G., H. S. Jacob, J. Balla, M. Rosenberg, K. Nath, F. Apple, J. W. Eaton and G. M. Vercellotti (1992). "Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium." *J Biol Chem* **267**(25): 18148-18153.
- Batist, G., A. Tulpule, B. K. Sinha, A. G. Katki, C. E. Myers and K. H. Cowan (1986). "Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells." *J Biol Chem* **261**(33): 15544-15549.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman (1990). "Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite - Implications for Endothelial Injury from Nitric-Oxide and Superoxide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(4): 1620-1624.
- Benavente-Garcia, O., J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuno and J. A. Del Rio (1997). "Uses and properties of Citrus flavonoids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(12): 4505-4515.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain (1999). "Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration." *Oxidants and Antioxidants, Pt A* **299**: 15-27.

- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews* **56**(11): 317-333.
- Burda, S. and W. Oleszek (2001). "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(6): 2774-2779.
- Buyukokuroglu, M. E., I. Gulcin, M. Oktay and O. I. Kufrevioglu (2001). "In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium." *Pharmacol Res* **44**(6): 491-494.
- Cai, Y. Z., Q. Luo, M. Sun and H. Corke (2004). "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer." *Life Sciences* **74**(17): 2157-2184.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs." *Physiological Reviews* **59**(3): 527-605.
- Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou (1999). "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms." *Food and Chemical Toxicology* **37**(9-10): 949-962.
- Chen, H. M., J. H. Hsu, S. F. Liou, T. J. Chen, L. Y. Chen, C. C. Chiu and J. L. Yeh (2014). "Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways." *Bmc Complementary and Alternative Medicine* **14**.
- Cohen, G. and P. Hochstein (1963). "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes." *Biochemistry* **2**: 1420-1428.
- Cohen, G. and P. Hochstein (1964). "Generation of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes by Hemolytic Agents." *Biochemistry* **3**: 895-900.
- Commandeur, J. N. M., G. J. Stijntjes and N. P. E. Vermeulen (1995). "Enzymes and Transport-Systems Involved in the Formation and Disposition of Glutathione S-Conjugates - Role in Bioactivation and Detoxication Mechanisms of Xenobiotics." *Pharmacological Reviews* **47**(2): 271-330.
- Croft, K. D. (1998). "The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids." *Towards Prolongation of the Healthy Life Span* **854**: 435-442.
- Davies, J. M. S., D. A. Horwitz and K. J. A. Davies (1994). "Inhibition of Collagenase Activity by N-Chlorotaurine, a Product of Activated Neutrophils." *Arthritis and Rheumatism* **37**(3): 424-427.
- Davies, K. J. A. (1986). "Free-Radicals Induce Lipid-Peroxidation and Protein-Degradation by Independent Mechanisms." *Journal of the American Oil Chemists Society* **63**(4): 418-419.
- Davies, K. J. A. (1995). "Oxidative stress: The paradox of aerobic life." *Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*(61): 1-31.
- Davies, K. J. A., A. Sevanian, S. F. Muakkassahkelly and P. Hochstein (1986). "Uric-Acid Iron-Ion Complexes - a New Aspect of the Antioxidant Functions of Uric-Acid." *Biochemical Journal* **235**(3): 747-754.
- del Rio, L. A., L. M. Sandalio, J. M. Palma, P. Bueno and F. J. Corpas (1992). "Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications." *Free Radic Biol Med* **13**(5): 557-580.
- Depierre, J. W. and R. Morgenstern (1983). "Comparison of the Distribution of Microsomal and Cytosolic Glutathione S-Transferase Activities in Different Organs of the Rat." *Biochemical Pharmacology* **32**(4): 721-723.

- Dewick, P. M. (2009). "The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids, in Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach." 3rd Edition Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Dixon, D. P., A. Laphorn and R. Edwards (2002). "Plant glutathione transferases." *Genome Biology* **3**(3).
- Ehrenkranz, J. R. L., N. G. Lewis, C. R. Kahn and J. Roth (2005). "Phlorizin: a review." *Diabetes-Metabolism Research and Reviews* **21**(1): 31-38.
- Elmastas, M., I. Turkecul, L. Ozturk, I. Gulcin, O. Isildak and H. Y. Aboul-Enein (2006). "Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey." *Comb Chem High Throughput Screen* **9**(6): 443-448.
- Erat, M. and H. Sakiroglu (2013). "The effect of some antineoplastic agents on glutathione S-transferase from human erythrocytes." *J Enzyme Inhib Med Chem* **28**(4): 711-716.
- Fenton, J. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J Chem Soc Trans* **65**: 899-910.
- Flohé, L. (1982). " in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed.), Academic Press, New York: 223-254.
- Floyd, R. A. (1999). "Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **222**(3): 236-245.
- Fridovich, I. (1976). "Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity." *Academic Press* **1**: 239-277.
- Fridovich, I. (1989). "Superoxide Dismutases - an Adaptation to a Paramagnetic Gas." *Journal of Biological Chemistry* **264**(14): 7761-7764.
- Frimmer, A. A. (1985). "Singlet oxygen." *CRC Pres*: 1-4.
- Gardner, P. R. and I. Fridovich (1991). "Superoxide Sensitivity of the Escherichia-Coli Aconitase." *Journal of Biological Chemistry* **266**(29): 19328-19333.
- Gasiorowski, K., E. Lamer-Zarawska, J. Leszek, K. Parvathaneni, B. B. Yendluri, Z. Blach-Olszewska and G. Aliev (2011). "Flavones from Root of *Scutellaria Baicalensis* Georgi: Drugs of the Future in Neurodegeneration?" *Cns & Neurological Disorders-Drug Targets* **10**(2): 184-191.
- Gulcin, I. (2002). Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes and investigation of some in vivo properties of nettle (*Urtica dioica*). PhD, Ataturk University.
- Gulcin, I. (2006). "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)." *Toxicology* **217**(2-3): 213-220.
- Gulcin, I. (2006). "Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine." *Life Sciences* **78**(8): 803-811.
- Gulcin, I. (2007). "Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa." *Amino Acids* **32**(3): 431-438.
- Gulcin, I. (2008). "Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent." *J Enzyme Inhib Med Chem* **23**(6): 871-876.
- Gulcin, I. (2009). "Antioxidant activity of L-adrenaline: A structure-activity insight." *Chemico-Biological Interactions* **179**(2-3): 71-80.

- Gulcin, I. (2010). "Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**(1): 210-218.
- Gulcin, I. (2012). "Antioxidant activity of food constituents: an overview." *Archives of Toxicology* **86**(3): 345-391.
- Gulcin, I. and A. Dastan (2007). "Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **22**(6): 685-695.
- Gulcin, I., H. A. Alici and M. Cesur (2005). "Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **53**(3): 281-285.
- Gulcin, I., M. Oktay, E. Koksall, H. Serbetci, S. Beydemir and O. I. Kufrevioglu (2008). "Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid." *Asian Journal of Chemistry* **20**(3): 2079-2090.
- Gulcin, I., R. Elias, A. Gepdiremen, K. Taoubi and E. Koksall (2009). "Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.)." *Wood Science and Technology* **43**(3-4): 195-212.
- Gulcin, I., U. Beydemir, H. A. Alici, M. Elmastas and M. E. Buyukokuroglu (2004). "In vitro antioxidant properties of morphine." *Pharmacological Research* **49**(1): 59-66.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." *Baillieres Clin Haematol* **2**(2): 195-256.
- Gutteridge, J. M. C., R. Richmond and B. Halliwell (1980). "Oxygen Free-Radicals and Lipid-Peroxidation - Inhibition by the Protein Ceruloplasmin." *Febs Letters* **112**(2): 269-272.
- Guvercin, S., M. Erat and H. Sakiroglu (2008). "Determination of some kinetic and characteristic properties of glutathione S-transferase from bovine erythrocytes." *Protein and Peptide Letters* **15**(1): 6-12.
- Güçlü, K., Apak, R., Özyürek, M. (2009). "Hidroksil ve Süperoksit Radikallerinin Süpürülmesine Dayalı Yeni Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi."
- Gyamfi, M. A., I. I. Ohtani, E. Shinno and Y. Aniya (2004). "Inhibition of glutathione S-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro." *Food and Chemical Toxicology* **42**(9): 1401-1408.
- Habdous, M., M. Vincent-Viry, S. Visvikis and G. Siest (2002). "Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity." *Clinica Chimica Acta* **326**(1-2): 131-142.
- Haber F, W. J. (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." *Proc Roy Soc Lond Series A* **147**: 332-351.
- Habig, W. H. and W. B. Jakoby (1981). "Assays for differentiation of glutathione S-transferases." *Methods Enzymol* **77**: 398-405.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." *Biochemical Society Transactions* **35**: 1147-1150.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). "Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - an Overview." *Methods in Enzymology* **186**: 1-85.

- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* **280**(1): 1-8.
- Harborne, J. B., H. Baxter and G. P. Moss (1999). *Phytochemical dictionary : a handbook of bioactive compounds from plants*. London, Taylor & Francis.
- Hayes, J. D. and D. J. Pulford (1995). "The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **30**(6): 445-600.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan and I. R. Jowsey (2005). "Glutathione transferases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88.
- Hayes, J. D., J. U. Flanagan and I. R. Jowsey (2005). "Glutathione transferases." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**: 51-88.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**(10): 572-584.
- Heinonen, O. P., J. K. Huttunen, D. Albanes and P. R. Taylor (1994). "Beta-Carotene, Vitamin-E, and Lung-Cancer - Reply." *New England Journal of Medicine* **331**(9): 613-613.
- Heo, H. J., Y. J. Kim, D. Chung and D. O. Kim (2007). "Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system." *Food Chemistry* **104**(1): 87-92.
- Hertog, M. G. L., E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993). "Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study." *Lancet* **342**(8878): 1007-1011.
- Hochstein, P., A. Sevanian and K. J. A. Davies (1985). "The Stabilization of Ascorbic-Acid by Uric-Acid." *Pediatric Research* **19**(7): 758-758.
- Hongyu, Z. (1999). "Theoretical elucidation of structure-activity relationship of flavonoid antioxidants." *Science in China* **42**: 106-112.
- Huang, D. J., B. X. Ou and R. L. Prior (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6): 1841-1856.
- Kappus, H. and A. T. Diplock (1992). "Tolerance and Safety of Vitamin-E - a Toxicological Position Report." *Free Radical Biology and Medicine* **13**(1): 55-74.
- Karagozler, A. A., B. Erdag, Y. C. Emek and D. A. Uygur (2008). "Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*." *Food Chemistry* **111**(2): 400-407.
- Kasote, D. M., M. V. Hegde and S. S. Katyare (2013). "Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: Cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy." *Biofactors* **39**(4): 392-406.
- Kaviarasan, S., G. H. Naik, R. Gangabaghirathi, C. V. Anuradha and K. I. Priyadarsini (2007). "In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds." *Food Chemistry* **103**(1): 31-37.
- Kerr, J. A., Calvert, J.G. and Demerjian, K.L. (1976). *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed.) **2**: 159-179.
- Kirkman, H. N. and G. F. Gaetani (1984). "Catalase - a Tetrameric Enzyme with 4 Tightly Bound Molecules of Nadph." *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America-Biological Sciences **81**(14): 4343-4347.
- Kodera, Y., K. Isobe, M. Yamauchi, K. Kondo, S. Akiyama, K. Ito, I. Nakashima and H. Takagi (1994). "Expression of glutathione-S-transferases alpha and pi in gastric cancer: a correlation with cisplatin resistance." *Cancer Chemother Pharmacol* **34**(3): 203-208.
- Koppenol, W. H. and J. F. Liebman (1984). "The Oxidizing Nature of the Hydroxyl Radical - a Comparison with the Ferryl Ion (Feo²⁺)." *Journal of Physical Chemistry* **88**(1): 99-101.
- Krishnaiah, D., R. Sarbatly and R. Nithyanandam (2011). "A review of the antioxidant potential of medicinal plant species." *Food and Bioproducts Processing* **89**(C3): 217-233.
- Kumagai, T., C. I. Muller, J. C. Desmond, Y. Imai, D. Heber and H. P. Koeffler (2007). "Scutellaria baicalensis, a herbal medicine: Anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines." *Leukemia Research* **31**(4): 523-530.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4." *Nature* **227**(5259): 680-&.
- Last, J. A., W. M. Sun and H. Witschi (1994). "Ozone, NO, and NO₂: oxidant air pollutants and more." *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 179-184.
- Lien, E. J., S. J. Ren, H. Y. H. Bui and R. B. Wang (1999). "Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(3-4): 285-294.
- Lind, C., P. Hochstein and L. Ernster (1982). "DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation." *Arch Biochem Biophys* **216**(1): 178-185.
- Li-Weber, M. (2009). "New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin." *Cancer Treatment Reviews* **35**(1): 57-68.
- Lowenthal, R. M. and K. Eaton (1996). "Toxicity of chemotherapy." *Hematology-Oncology Clinics of North America* **10**(4): 967-+. M.S., B. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature* **26**: 1199-1200.
- MacDonald-Wicks, L. K., L. G. Wood and M. L. Garg (2006). "Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**(13): 2046-2056.
- Magalhaes, L. M., M. Santos, M. A. Segundo, S. Reis and J. L. F. C. Lima (2009). "Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity." *Talanta* **77**(5): 1559-1566.
- Manach, C., A. Mazur and A. Scalbert (2005). "Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases." *Current Opinion in Lipidology* **16**(1): 77-84.
- Mannervik, B., P. G. Board, J. D. Hayes, I. Listowsky and W. R. Pearson (2005). "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases." *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases* **401**: 1-8.
- Mannervik, B., V. M. Castro, U. H. Danielson, M. K. Tahir, J. Hansson and U. Ringborg (1987). "Expression of Class Pi-Glutathione Transferase in Human-Malignant Melanoma-Cells." *Carcinogenesis* **8**(12): 1929-1932.

- Marcus, C. J., W. H. Habig and W. B. Jakoby (1978). "Glutathione Transferase from Human Erythrocytes - Nonidentity with Enzymes from Liver." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **188**(2): 287-293.
- Marler, L., M. Conda-Sheridan, M. A. Cinelli, A. E. Morrell, M. Cushman, L. A. Chen, K. Huang, R. Van Breemen and J. M. Pezzuto (2010). "Cancer Chemopreventive Potential of Aromathecins and Phenazines, Novel Natural Product Derivatives." *Anticancer Research* **30**(12): 4873-4882.
- Mccord, J. M. and E. D. Day (1978). "Superoxide-Dependent Production of Hydroxyl Radical Catalyzed by Iron-Edta Complex." *Febs Letters* **86**(1): 139-142.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* **244**(22): 6049-6055.
- Mccord, J. M. and I. Fridovich (1988). "Superoxide-Dismutase - the 1st 20 Years (1968-1988)." *Free Radical Biology and Medicine* **5**(5-6): 363-369.
- Mckenna, S. M. and K. J. A. Davies (1988). "The Inhibition of Bacterial-Growth by Hypochlorous Acid - Possible Role in the Bactericidal Activity of Phagocytes." *Biochemical Journal* **254**(3): 685-692.
- Meyer, A. S., M. Heinonen and E. N. Frankel (1998). "Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation." *Food Chemistry* **61**(1-2): 71-75.
- Middleton, E., C. Kandaswami and T. C. Theoharides (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacological Reviews* **52**(4): 673-751.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric-Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology." *Pharmacological Reviews* **43**(2): 109-142.
- MS, B. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature* **26**: 1199-1200.
- Nielsen, D., C. Maare and T. Skovsgaard (1996). "Cellular resistance to anthracyclines." *General Pharmacology* **27**(2): 251-255.
- O'Brien, M. L. and K. D. Tew (1996). "Glutathione and related enzymes in multidrug resistance." *Eur J Cancer* **32A**(6): 967-978.
- Offei-Okanye, R., Patterson, J.L., Walker, L.T., Boateng, J. and Verghese, M. (2015). "Chemopreventive Potential of Ginger on Hep2G Cells." *International Journal of Cancer Research* **11** (2): 52-66.
- Pacifici, G. M., M. Franchi, C. Bencini, F. Repetti, N. Dilascio and G. B. Muraro (1988). "Tissue Distribution of Drug-Metabolizing-Enzymes in Humans." *Xenobiotica* **18**(7): 849-856.
- Packer, J. E., T. F. Slater and R. L. Willson (1979). "Direct Observation of a Free-Radical Interaction between Vitamin-E and Vitamin-C." *Nature* **278**(5706): 737-738.
- Pannala, A. S., T. S. Chan, P. J. O'Brien and C. A. Rice-Evans (2001). "Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**(5): 1161-1168.
- Parr, A. J. and G. P. Bolwell (2000). "Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7): 985-1012.

- Pokorny, J. (2007). "Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? (vol 109, pg 629, 2007)." *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**(8): 883-883.
- Pryor, W. A. (1986). "The Radical View." *Advances in Free Radical Biology and Medicine* **2**(2): 281-282.
- Pryor, W. A. (1994). "Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung." *Free Radic Biol Med* **17**(5): 451-465.
- Puupponen-Pimia, R., L. Nohynek, C. Meier, M. Kahkonen, M. Heinonen, A. Hopia and K. M. Oksman-Caldentey (2001). "Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries." *Journal of Applied Microbiology* **90**(4): 494-507.
- Quintanilha, A. T., L. Packer, J. M. S. Davies, T. L. Racanelli and K. J. A. Davies (1982). "Membrane Effects of Vitamin-E-Deficiency - Bioenergetic and Surface-Charge Density Studies of Skeletal-Muscle and Liver-Mitochondria." *Annals of the New York Academy of Sciences* **393**(Sep): 32-47.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.K.M. and Freeman, B.A. (1990). "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." *Arch Biochem Biophys.* **288**: 481-487.
- Ranson, H., L. Rossiter, F. Ortell, B. Jensen, X. L. Wang, C. W. Roth, F. H. Collins and J. Hemingway (2001). "Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*." *Biochemical Journal* **359**: 295-304.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(9-10): 1231-1237.
- Rezk, B. M., G. R. M. M. Haenen, W. J. F. van der Vijgh and A. Bast (2002). "The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**(1): 9-13.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." *Trends in Plant Science* **2**: 152-159.
- Rossjohn, J., G. Polekhina, S. C. Feil, N. Allocati, M. Masulli, C. Di Ilio and M. W. Parker (1998). "A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications." *Structure with Folding & Design* **6**(6): 721-734.
- Ruzza, P. and A. Calderan (2013). "Glutathione Transferase (GST)-Activated Prodrugs." *Pharmaceutics* **5**(2): 220-231.
- Ruzza, P., A. Rosato, C. R. Rossi, M. Floreani and L. Quintieri (2009). "Glutathione transferases as targets for cancer therapy." *Anticancer Agents Med Chem* **9**(7): 763-777.
- Samman, S., Lyons Wall, P. M., & Cook, N. C. (1998). *Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives*. New York: Marcel Dekker, In C. A. .
- Sargent, J. M., C. Williamson, A. G. Hall, A. W. Elgie and C. G. Taylor (1999). "Evidence for the involvement of the glutathione pathway in drug resistance in AML." *Adv Exp Med Biol* **457**: 205-209.
- Scott, M. D., T. C. Wagner and D. T. Chiu (1993). "Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate

- dehydrogenase-deficient erythrocytes." *Biochim Biophys Acta* **1181**(2): 163-168.
- Shahidi, F. and M. Naczki (1995). *Food phenolics : sources, chemistry, effects, applications*. Lancaster, Pa., Technomic Pub. Co.
- Sies, H. (1991). "Oxidative stress: from basic research to clinical application." *Am J Med* **91**(3C): 31S-38S.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**(2): 291-295.
- Singhal, S. S., S. Gupta, H. Ahmad, R. Sharma and Y. C. Awasthi (1990). "Characterization of a Novel Alpha-Class Anionic Glutathione S-Transferase Isozyme from Human Liver." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **279**(1): 45-53.
- Stavrovskaya, A. A. (2000). "Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells." *Biochemistry-Moscow* **65**(1): 95-106.
- Stenberg, G., P. G. Board and B. Mannervik (1991). "Mutation of an Evolutionarily Conserved Tyrosine Residue in the Active-Site of a Human Class Alpha-Glutathione Transferase." *Febs Letters* **293**(1-2): 153-155.
- Sukhorukov, V. L., M. Kurschner, S. Dilsky, T. Lisec, B. Wagner, W. A. Schenk, R. Benz and U. Zimmermann (2001). "Phloretin-induced changes of lipophilic ion transport across the plasma membrane of mammalian cells." *Biophysical Journal* **81**(2): 1006-1013.
- Tan, K. L., G. Chelvanayagam, M. W. Parker and P. G. Board (1996). "Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: Catalysis with different substrates involves different residues." *Biochemical Journal* **319**: 315-321.
- Turk, S., G. K. Erkmen, O. Dalmizrak, I. H. Ogus and N. Ozer (2015). "Purification of Glutathione S-Transferase pi from Erythrocytes and Evaluation of the Inhibitory Effect of Hypericin." *Protein Journal* **34**(6): 434-443.
- Valenta, C., J. Cladera, P. O'Shea and J. Hadgraft (2001). "Effect of phloretin on the percutaneous absorption of lignocaine across human skin." *Journal of Pharmaceutical Sciences* **90**(4): 485-492.
- van Bladeren, P. J. (2000). "Glutathione conjugation as a bioactivation reaction." *Chemico-Biological Interactions* **129**(1-2): 61-76.
- Villano, D., M. S. Fernandez-Pachon, M. L. Moya, A. M. Troncoso and M. C. Garcia-Parrilla (2007). "Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical." *Talanta* **71**(1): 230-235.
- Wang, Y., Y. G. Zu, J. J. Long, Y. J. Fu, S. M. Li, D. Y. Zhang, J. Li, M. Wink and T. Efferth (2011). "Enzymatic water extraction of taxifolin from wood sawdust of *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr. and evaluation of its antioxidant activity." *Food Chemistry* **126**(3): 1178-1185.
- Wang, Z. H., K. Ah Kang, R. Zhang, M. J. Piao, S. H. Jo, J. S. Kim, S. S. Kang, J. S. Lee, D. H. Park and J. W. Hyun (2010). "Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action." *Environ Toxicol Pharmacol* **29**(1): 12-18.
- Yen, G. C., P. D. Duh and H. L. Tsai (2002). "Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid." *Food Chemistry* **79**(3): 307-313.

- Zhang, X. W., W. F. Li, W. W. Li, K. H. Ren, C. M. Fan, Y. Y. Chen and Y. L. Shen (2011). "Protective effects of the aqueous extract of *Scutellaria baicalensis* against acrolein-induced oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells." *Pharmaceutical Biology* **49**(3): 256-261.
- Zhang, Y., O. Marcillat, C. Giulivi, L. Ernster and K. J. A. Davies (1990). "The Oxidative Inactivation of Mitochondrial Electron-Transport Chain Components and Atpase." *Journal of Biological Chemistry* **265**(27): 16330-16336.



ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Erzurum’da tamamladı. 2003 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde başladığı üniversite eğitimini 2007 yılında tamamladı. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya bilim dalında başladığı yüksek lisans öğrenimini 2010 yılında tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya bilim dalında başladığı doktora öğrenimine devam etmektedir.

