



**FİKOSİYANİN VE PROANTOSİYANİDİN'İN
ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE ENZİM
İNHİBİSYONU
ETKİLERİ**

Ahmet Gökhan OLTULU

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**FİKOSİYANİN VE PROANTOSİYANİDİN'İN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE
ENZİM İNHİBİSYONU ETKİLERİ**

(Antioxidant Capacity and Enzyme Inhibition Effects of Phycocyanin and Proanthocyanidin)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet Gökhan OLTULU

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Erzurum
Eylül, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ahmet Gökhan OLTULU tarafından hazırlanan “**Fikosiyanin Ve Proantosiyanidin’in Antioksidan Kapasiteleri Ve Enzim İnhibisyonu Etkileri**” başlıklı çalışması 09 / 09 / 2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, - Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU *İmza: Aslı Islak İmzalıdır.*
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN *İmza: Aslı Islak İmzalıdır.*
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Fevzi TOPAL *İmza: Aslı Islak İmzalıdır.*
Gümüşhane Üniversitesi

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

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

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır.

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora tezi olarak *Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN* danışmanlığında sunulan “Fikosiyanin Ve Proantosiyanın Antioksidan Kapasitesi ve Enzim İnhibisyonu Etkileri” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	18	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Yöntem	22	35
Bulgular	12	20
Tartışma	5	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ahmet Gökhan OLTULU	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
16.9.2022	16.9.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

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

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmasının deneysel çalışmaları Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda çalışılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabrını, zamanını, inancını ve hoşgörülerini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bizlere yol gösteren saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e

Çalışmalarında fakülte ve bölümümüzdeki tüm imkânları bize sunan dekanımız Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e

Yaptığımız çalışmalar sırasında destek aldığım Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki çalışma hocalarım Doç. Dr. Yeliz DEMİR, Öğr. Gör. Adem ERTÜRK, Dr. Işıl Nihan KORKMAZ ve çalışma arkadaşım Zehra Betül TORTUMLU'ya Biyokimya Araştırma Labratuvarındaki bütün çalışma arkadaşlarıma,

Desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan ve destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet Gökhan OLTULU

Eylül 2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ FİKOSİYANİN VE PROANTOSİYANİDİN'İN ANTIÖKSİDAN KAPASİTELERİ VE ENZİM İNHİBİSYONU ETKİLERİ Ahmet Gökhan OLTULU

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Amaç: Çalışmamızda fenolik bir bileşik olan Proantosiyanidin ve Fikosiyanın'ın antioksidan kapasiteleri ile asetilkolinesteraz (AChE), α -glukozidaz, α -amilaz enzimleri ile insan eritrosit karbonik anhidraz (hCA) I ve II izoenzimleri üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı.

Yöntem: Çalışmanın ilk kısmında antioksidan ile radikal giderme kapasitesini gözlemlemek için, kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme, ferröz iyonları (Fe^{2+}) indirgeme, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikalini (DPPH $\cdot$) giderme, 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikalini (ABTS $^{+}$) giderme ve N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikalini (DMPD $^{+}$) giderme aktiviteleri çalışıldı. Değerlendirme standartı olarak BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol antioksidanları kullanıldı. Çalışmadaki ikinci aşama ise insan karbonik anhidraz enzimleri I ve II (hCA I ve II) Sefarose-4B-L-Tirozin Sülfanilamid afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzimlerin saflığını ölçmek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı. Sonrasında Proantosiyanidin ve fikosiyanın'ın hCA I, hCA II, AChE, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleriyle inhibisyon üzerine etkisi araştırıldı. Asetilkolinesteraz, hCA I, hCA II, α -glukozidaz ve α -amilaz ile inhibisyon çalışmaları yapıldı ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

Bulgular Özellikle Proantosiyanidin maddelerinin standard maddelere göre oldukça etkili antioksidan aktivelere sahip olduğu gözlemlendi. Fikosiyanın'ın de etkili bir şekilde ABTS radikallerini giderdiği gözlemlendi. Yine enzimlerin de kullanılan Asetazolamid, Takrin ve Acarboz gibi standard inhibitörlere kıyaslandığında etkili bir şekilde inhibisyona sahip oldukları bulundu.

Sonuç: Fikosiyanın ve özellikle Proantosiyanidin kuvvetli antioksidan sergilediği ve çalışmada kullanılan metabolik enzimler üzerinde de ciddi anlamda inhibisyona sahip olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Enzim, Enzim inhibisyonu, Proantosiyanidin ve Fikosiyanın.

Eylül 2022, 86 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

PHYCOCYANINE AND PROANTHOCYANIDIN ANTIOXIDANT CAPACITIES AND ENZYME INHIBITION EFFECTS

Ahmet Gökhan OLTULU

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Objective: In our study, the antioxidant capacities of Proanthocyanidin and Phycocyanin, which are phenolic compounds, and their in vitro inhibition effects on acetylcholinesterase (AChE), α -glucosidase, α -amylase enzymes and human erythrocyte carbonic anhydrase (hCA) I and II isoenzymes were investigated.

Method: In the first part of the study, to observe the antioxidant radical scavenging capacity, cupric ions (Cu^{2+}) reduction, ferrous ions (Fe^{2+}) reduction, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil free radical ($\text{DPPH}\cdot$) scavenging, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthioazoline-6-sulfonic acid) radical ($\text{ABTS}\cdot+$) scavenging activities and N,N-dimethyl-p-phenylenediamine radical ($\text{DMPD}\cdot+$) scavenging activities were studied. BHA, BHT, trolox and α -tocopherol antioxidants were used as evaluation standards. In the second step of the study, human carbonic anhydrase enzymes I and II (hCA I and II) were purified by Sefarose-4B-L-Tyrosine Sulfanilamide affinity column chromatography. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to measure the purity of the enzymes. Afterwards, the effects of proanthocyanidin and phycocyanin on inhibition by hCA I, hCA II, AChE, α -amylase and α -glucosidase enzymes were investigated. Inhibition studies were performed with acetylcholinesterase, hCA I, hCA II, α -glucosidase and α -amylase and IC_{50} values were calculated.

Results: It was observed that especially Proanthocyanidin substances had very effective antioxidant activities compared to standard substances. Phycocyanin was also observed to effectively scavenge ABTS radicals. Again, enzymes were found to have effective inhibition when compared to standard inhibitors such as Acetazolamide, Tacrine and Acarbose.

Conclusion Conclusion: It was found that phycocyanin and especially Proanthocyanidin exhibited strong antioxidants and had a serious inhibition on the metabolic enzymes used in the study.

Keywords: Antioxidant activity, Enzyme, Enzyme inhibition, Proanthocyanidin and Phycocyanin.

September 2022, 86 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
Antioksidanlar	1
Doğal antioksidanlar	3
Fenolik Bileşikler	4
Flavonoidler	7
Proantosiyanın.....	7
Fikosiyanın.....	11
Sentetik antioksidan maddeler	13
Enzimler	13
Karbonik Anhidrazlar.....	14
Asetilkolinesteraz.....	16
α -Glukozidaz enzimi	17
α -Amilaz enzimi.....	18
Enzim inhibisyonu	18
Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon.....	19
Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon.....	19
Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyon.....	19
Geri dönüşümsüz inhibisyon.....	20
Çalışmanın Amacı.....	21
KURAMSAL TEMELLER.....	22
MATERYAL VE YÖNTEM	25
Materyal	25

Kullanılan kimyasal maddeler.....	25
Kullanılan çözeltiler	25
Yöntemler.....	28
Antioksidan yöntemler	28
Enzim İnhibisyon Çalışmaları.....	31
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırması ile ilgili çalışmalar.....	31
CA izoenzimleri üzerine proantosiyanın ile fikosiyanın etkilerinin belirlenmesi	31
AChE üzerine proantosiyanın ile fikosiyanın etkisinin belirlenmesi.....	32
α -Glikozidaz ve α -Amilaz üzerine proantosiyanın ile fikosiyanın etkilerinin belirlenmesi	32
ARAŞTIRMA BULGULARI	34
Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Bulgular	34
Fe^{3+} indirgeme kuvveti analiz sonuçları	34
Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti sonuçları	34
ABTS radikal giderme aktivitesi sonuçları	35
DMPD radikal giderme aktivitesi sonuçları.....	36
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi sonuçları	38
Enzim İnhibisyonları ile İlgili Bulgular	39
α -Amilaz enzim inhibisyonu sonuçları	39
Asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları	40
hCA izoenzimleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları	42
α -Glikozidaz inhibisyonu ve sonuçları	46
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKÇA	58
ÖZGEÇMİŞ.....	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. DPPH Radikal Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları	29
Tablo 2. ABTS Radikal Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları	29
Tablo 3. DMPD ⁺ Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları.....	30
Tablo 4. Cu ²⁺ İndirgeme Kapasitesi (Kuprak Metodu) Kullanılan Reaktifler ve Miktarları...	30
Tablo 5. Fe ³⁺ İndirgeme Kapasitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları.....	31
Tablo 6. AChE Enzimi Aktivite Tayini İçin Kullanılan Reaktifler ve Kullanım Sırası	32
Tablo 7. α-Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayin İçin Kullanılan Reaktif Miktarı ve Sırası ..	33
Tablo 8. α-Amilaz Enziminin Aktivite Tayin İçin Kullanılan Reaktif Miktarı ve Sırası	33
Tablo 9. Radikal Giderme Metotlarında Prontosiyanidin, Fikosiyanin ve Standard Antioksidanlara ait IC50 Değerleri	53
Tablo 10. Antioksidan Maddelerin 45 µg/mL Konsantrasyonda İki İndirgeme Metdou İle Karşılaştırılması	54
Tablo 11. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin CA I İzofrmu İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri	56
Tablo 12. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin CA II İzofrmu İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri	56
Tablo 13. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin AChE İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri	56
Tablo 14. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin α-glikozidaz İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri	57
Tablo 15. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin α-amilaz İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fenolik antioksidanların sınıflandırılması.....	6
Şekil 2. Proantosiyanidin molekül formülü.....	8
Şekil 3. Proantosiyanidin'in (epikatekin) biyosentetik yolu.....	9
Şekil 4. Fikosiyanin yapısı. Fikosiyanin alt birimlerinin her biri bir polipeptit zinciri ve bir (α -alt birimi) veya iki (β -alt birimi) kromoforefikobilin içerir. Polipeptit zinciri ile kromofor arasındaki bağlantı tiyoester bağıdır	12
Şekil 5. Karbonik anhidraz enziminin etki ve inhibisyon mekanizmaları	15
Şekil 6. Asetilkolin'in AChE enzimi katalizörlüğünde asetat ve koline hidrolizi	16
Şekil 7. α -Glikozidaz enziminin metabolizmadaki etki mekanizması	17
Şekil 8. α -Glikozidaz enzimi için inhibe olma mekanizması.....	18
Şekil 9. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif) gösterimi.....	19
Şekil 10. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon gösterimi	19
Şekil 11. Yarışmasız (Unkompetitif) inhibisyon.....	20
Şekil 12. Lineweaver-Burk grafikleri ile inhibisyon türünün belirlenmesi. A. Yarışmalı İnhibisyon, B. Yarışmasız İnhibisyon, C. Yarı Yarışmalı İnhibisyon.....	20
Şekil 13. Standart antioksidan olarak kullanıldığımız BHA, α -tokoferol, BHT ve troloks'un proantosiyanidin'in ve fikosiyanin'in farklı miktarlardaki (15-45 $\mu\text{g/mL}$) Fe^{+3} (ferrik iyonları) indirgeme kuvveti ile kıyaslanması	34
Şekil 14. Standart antioksidan olarak kullanıldığımız BHA, α -tokoferol, BHT ve troloks'un proantosiyanidin'in ve fikosiyanin'in farklı miktarlardaki (15-45 $\mu\text{g/mL}$) Cu^{2+} (kuprik iyonlarını) indirgeme aktivitesinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 15. ABTS ⁺⁺ Metodu için hazırlanmış olan standart grafik.....	35
Şekil 16. Fikosiyanin'in ve proantosiyanidin'in farklı miktarlardaki (15-45 $\mu\text{g/mL}$) ABTS ⁺⁺ radikal giderme aktivitesinde standart olarak kullanılan BHA, troloks ve BHT antioksidanları ile kıyaslanması.....	36
Şekil 17. DMPD ⁺ giderme aktivitesi için hazırlanmış olan standart grafik ($r^2:0,9970$).....	37
Şekil 18. Fikosiyanin'in ve proantosiyanidin'in farklı miktarlarda ki (15-45 $\mu\text{g/mL}$) DMPD ⁺ giderme aktivitesinde standart antioksidan görevinde kullanılan troloks, BHA ve BHT ile karşılaştırması	38
Şekil 19. DPPH ⁺ giderme aktivitesi için hazırlanan standart grafik	38

Şekil 20. Fikosiyanin'in ve proantosiyamidin'in farklı miktarlarda ki (15-45 µg/mL) DPPH radikal giderme aktivitesinin standart antioksidan olarak kullanılan BHA, BHT ve Troloks ile karşılaştırılması.....	39
Şekil 21. Proantosiyamidin maddesinin α -amilaz enzimi ile aktivite (%) grafiği.....	40
Şekil 22. Fikosiyanin maddesinin α -amilaz enzimi ile aktivite (%) grafiği.....	40
Şekil 23. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin için aktivite (%)-[Proantosiyamidin] grafiği	41
Şekil 24. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği	41
Şekil 25. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin için aktivite (%)-[Fikosiyanin] grafiği.....	42
Şekil 26. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 27. hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin için aktivite (%)-[Proantosiyamidin] grafiği	43
Şekil 28. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 29. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin için aktivite (%)-[Fikosiyanin] grafiği.....	44
Şekil 30. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği	44
Şekil 31. hCAII izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin için aktivite (%)-[Proantosiyamidin] grafiği.....	45
Şekil 32. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin'in K_i değerini belirlemek için üç değişik konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği	45
Şekil 33. hCAII izoenzimi ile inhibisyon etkisi gösteren Fikosiyanin için aktivite (%)-[Fikosiyanin] grafiği	46
Şekil 34. Fikosiyanin hCAII enzimi kullanılarak üç farklı substrat konsantrasyonuyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 35. α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyamidin için aktivite (%)-[Fikosiyanin] grafiği.....	47

Şekil 36. Proantosiyanın'ın α -Glikozidaz enzimi kullanılarak üç farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 37. α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanın için aktivite (%) - [Fikosiyanın] grafiği.....	48
Şekil 38. Fikosiyanın'ın α -Glikozidaz enzimi kullanılarak üç farklı substrat konsantrasyonu ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48
Şekil 39. Proantosiyanın muhtemel DPPH radikal giderme mekanizması	53
Şekil 40. Cu^{2+} -Neokuprin kompleksinin Proantosiyanın gibi bir antioksidan molekülün varlığında indirgenme reaksiyonu	55
Şekil 41. Bir oksidan olan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ oksidan varlığında ABTS.+ oluşum ve giderme	55



KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CA	Karbonik anhidraz enzimi
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ^{•+}	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
DM	Diyabetes mellitus
I	İnhibitör
IC ₅₀	Mevcut konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim-inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
PER	Amonyum persülfat
PNF	<i>p</i> -Nitrofenilasetat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimli reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız

GİRİŞ

Antioksidanlar

Reaktif oksijen türleri (ROS) sürekli olarak normal hücresel süreçler tarafından endojen olarak ve çevresel faktörler tarafından da ekzojen olarak oluşturulur (Aksu ve ark. 2016). ROS, hipokloröz asit (HOCl) hidrojen, hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1O_2$) gibi radikal olmayan çeşitleri ve süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH) ve hidroperoksit (ROO) gibi serbest radikalleri içerir (Gülçin, 2020). Fizyolojik konsantrasyonlarda serbest radikaller, bir hücre sinyal molekülü olarak hareket etmek gibi bir dizi faydalı biyolojik fonksiyona sahiptir. Bunlar arasında en yaygın hücre tepkilere karşı cevap; hücre canlılığının devamı, hücre göçünün ve farklılaşmasının kontrolü; hücreleri patolojik ve enfeksiyöz ajanlara karşı korumak ve onları inaktive etmek sayılabilir (Li *et al.* 2013; Catarzi *et al.* 2011). Ancak fizyolojik konsantrasyonlardan daha yüksek ROS seviyeleri oksidan-antioksidan dengesini bozar ve oksidatif strese neden olur (Rahal *et al.* 2014). Oksidatif stres, kanser, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, inflamasyon, yaşlanma, cilt lezyonları, romatoid artrit ve nörolojik hastalıklar gibi bir dizi hastalığı indükleyen bir faktördür. Enzimatik veya enzimatik olmayan endojen antioksidanlar ROS'u vücuttan atmakta yetersiz kaldığında, vücudun fenolik bileşikler gibi ekzojen doğal antioksidanları alması önemli hale gelir (Pham-Huy *et al.* 2008).

Oksijenli solunum yapan canlılarda substratların okside edilmesiyle ATP elde edilir. Bu esnada oksijen redüksiyonu ile birçok radikal ve reaktif oluşur. İnsan vücudunda Reaktif Oksijen Türleri (ROS) hücresel döngüler ve aktiviteler sonucunda oluşmakta ve birikmesiyle hücre-doku hasarına neden olmaktadır. Bu reaktif türler başta kanser olmak üzere birçok hastalığa sebep olarak gösterilmektedir. Ancak gerek endojen gerek ekzojen antioksidan takviyeleri sayesinde serbest radikallerin hastalık oluşturma oranı önemli ölçüde azalmaktadır. Ekzojen günümüzde daha çok doğal antioksidanlar tercih edilmektedir. Doğal besin kaynaklı antioksidanlar için özellikle bitkilerin kullanımı son zamanlarda ciddi bir şekilde artmıştır (Gülçin ve ark.. 2009).

Antioksidanlar, gıda ve farmasötik ürünlerdeki oksidatif bozulmaya ve oksidatif stres aracılı patolojik süreçlere karşı koruyucu rolleri artan bir ilgiye sahiptir. Antioksidanlar, insan vücudunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerini azaltmak ve gıda sistemlerinde lipidlerin oksidasyonunu engellemede önemli bir rol oynamaktadır (Gülçin, 2012; Çakmakçı ve

ark. 2015; Göçer ve ark. 2013). Gıda sistemlerinde, gıda kaynaklı antioksidanların kullanılmasıyla lipid peroksidasyonunu geciktirilir veya tamamen engellenir. Bu şekilde gıdaların işleme ve stoklama sırasında lezzet, renk ve tatlarının korunması sağlanır (Bursal ve ark. 2013; Çakmakçı ve ark. .2015). Ayrıca antioksidanlar, hücre ve dokularda amino asit, protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi oldukça önemli olan hücresel biyomoleküllerin korumasını sağlamaktadır (Sindhi *et al.*. 2013). Dah basit bir şekilde antioksidan bir madde, diğer moleküllerin okside olmasını engelleyebilen bir maddeler olarak da tanımlanabilir. Bu tanıma gıdalar açısından bakıldığında az miktarda bulunduğu durumlarda bile gıdasal bileşenlerin oksidasyonunu yavaşlatan veya tamamen inhibe eden maddeler olarak tanımlanır. Ancak bu tanım biyolojik açıdan düşünüldüğünde biyomoleküllerin oksidasyonunu geciktiren, önleyen veya tamamen ortadan kaldıran moleküller olarak tanımlanabilir (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1993; Halliwell 1995; Gülçin, 2020).

Temel olarak, gıdalar üzerinde olumsuz etki bırakmaması ve raf ömrünü uzatması gibi benzersiz özellikleri ile antioksidanlar gıda katkı maddelerinin vazgeçilmez grubu haline gelmiştir. Bununla birlikte antioksidan maddeler metabolizmayı serbest radikallerden ve ROS'nin zararlı etkilerinden koruyabilir. Lipid peroksidasyonunun yanı sıra bazı kronik hastalıkların ilerlemesini yavaşlatırlar. Son zamanlarda, güvenli ve alternatif besin olarak antioksidan kaynaklarının belirlenmesine ve öncelikle bitki kaynaklı doğal antioksidanların araştırılmasına yönelik büyük ilgi bulunmaktadır. Sebze, meyve ile beslenme, ciddi hastalıklardan olan koroner ateroskleroz ve kanser dâhil birçok kronik hastalığa yakalanma riskini azalttığı da bilinmektedir. Bu hastalıkların gelişiminin meyve ve sebzelerin tüketimi ile azaldığı da ortaya konulmuştur (Rimm *et al.* 1996). Yine yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarla yeterli miktarda sebze ve meyve alımının kanser, koroner kalp damar hastalıklarına yakalanma riskindeki azalma ile yaşa bağlı hastalıklardan kaynaklanan ölüm oranlarının düşmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu da bilinmektedir (Ganesan *et al.* 2011). Antioksidanlar genel olarak iki grup altında sınıflandırılır:

- a. Enzimatik olan antioksidanlar: Bunlar arasında organizmada en aktif olanları superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), ve glutatyon redüktaz (GSSG-R)'dir (Cheeseman and Slater 1993; Apak *et al.* 2022).
- b) Enzimatik olmayan olan antioksidanlar: Bu tür antioksidan maddeler vücut içi (endojen) ve vücut dışı (ekzojen) kökenli olmak üzere ikiye ayrılırlar. Endojen yani vücut içi antioksidanlara melatonin, sistein, seruloplazmin, transferrin, adrenalın, laktoferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin ve

glutasyon örnek verilebilir. Ekzojen yani vücut dışı antioksidanlara ise α -tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), ve β -karoten örnek verilebilir.

Antioksidanlar savunma etkilerini farklı mekanizmalar ile göstermektedir. Aşağıda antioksidan maddelerin etkinlikleri düzenlenmiştir;

1. Serbest radikallerin oluşumunu engellemesi (scavenging/temizleyici etki): Serbest radikallerin oluşumunu tamamen engeller veya etkilerini azalarakkatkı sağlar. Enzimatik antioksidanlardan olan glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz enzimleri ile metalleri bağlayan Ferritin, Albumin, Hemoglobini Transferin, Seruloplazmin bazı proteinler örnek olarak verilebilir.
2. Oluşan radikallerin temizlenmesi (quencher/giderici etki): Serbest radikallere bir hidrojen atomu ekleyerek aktivitelerini engelleyen bileşiklerdir. Askorbik asit vitamini (C Vitamini), karotenler (A vitamin), α -Tokoferol (E vitamin), flavonoidler ve antosiyanidinler bu tür antioksidan gurubuna örnek olarak verilebilir.
3. Yıpranmış hücresel bileşenlerin onarılması (repair/tamir edici etki): DNA onarım mekanizması bazı enzimler bu şekilde etki göstermektedirler. Ayrıca bu gruba metiyonin sülfoksit redüktaz da olarak gösterilebilir.
4. Radikalik zincir reaksiyonlarının durdurulması (chain breaking/zincir kırıcı etki): Zincirleme tepkimelerin sırasını bozarak oksidan etkiyi sonlandırırlar. Hemoglobin, vitaminler, ürik asit, albumin, bilirubin, seruloplazmin ve mineraller zincir kıran etki göstermektedirler.

Doğal antioksidanlar

Son zamanlarda, sentetik antioksidanların sahip olduklar bazı toksik ve istenmeyen birçok yan etkileri üretici ve tüketicileri ciddi anlamda düşündürmekte ve endişeye sevk etmektedir. Ayrıca, bitki ürünlerinin ROS'a ve serbest radikallerin neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlamak için antioksidan görevi görme potansiyeli araştırılmıştır (Hou *et al.* 2003). Bu nedenle, doğal gıda katkı maddelerinin artan popülaritesinden dolayı gıda üreticilerini sentetik antioksidanlardan doğal antioksidan bileşenlerle yönlendirmiştir neden olabilir. Bu şekilde herhangi bir sağlık riski oluşturmeyen doğal kaynaklı antioksidanlar üzerine yapılan araştırmalar da hız kazanmıştır (Shahidi and Wanasundara 1995; Shahidi and Ambigaipalan 2015). Doğal antioksidanların kaynakları, öncelikle meyveler, sebzeler, tohumlar, kabuklu yemişler, yapraklar, dörtlü kökler ve kabuklar dahil olmak üzere bitkilerin tüm kısımlarında meydana gelebilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerdir. Bitkiler, normal metabolik yollarında diğerlerinin yanı sıra favonoidler, uçucu yağlar, alkaloidler, liganlar, terpenler, terpenoidler, tokoferoller, fenolik asitler, fenolikler, peptitler, çok işlevli organik

asitler gibi geniş bir metabolit üretmektedir. Bununla birlikte, doğal antioksidanların ana kaynakları, öncelikle bitkilerin tüm kısımlarında bulunabilen bitki fenolikleridir (Shahidi and Ambigaipalan 2015). Bu metabolitler, bitkilerin istenmeyen etkilerden korunmasında büyük rol oynar. İnsan beslenmesi, antioksidan aktiviteyi ihtiva eden veya yapısal niteliklerine açısından ROS'u temizlemesi önerilen bir dizi farklı bileşik içerir. İnsan beslenmesi, antioksidan aktivitelere sahip olan veya yapısal niteliklerine göre ROS'u temizlemesi önerilen bir dizi farklı bileşik içerir. Diyetle bulunan antioksidanlarının en önemlileri C vitamini, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidlerdir. C vitamini dışında, bu antioksidanların her grubu yapısal olarak farklı bir dizi bileşikten oluşur. Örneğin bugüne kadar 600'den fazla farklı karotenoid tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık elli tanesi insan diyetinde bulunmuştur (Sies and Stahl 1995; Rice-Evans and Miller 1996). Diyetle, bulunan bu bileşiklerinin ayrıca sinerjik etkileri de bulunmaktadır (Diplock *et al.* 1998).

Tüketiciler için herhangi bir sağlık riski oluşturmadıkları düşünülür (Shahidi ve Wanasundara 1995; Shahidi ve Ambigaipalan 2015). Doğal antioksidanların kaynakları, öncelikle tohumlar, meyveler, sebzeler, yapraklar, kabuklu yemişler, kök unları ve ağaç kabukları ile birlikte bitkilerin tüm kısımlarında oluşabilen fenolik bileşiklerdir. Bu metabolitler, bitkilerin istenmeyen etkilerden korunmasında büyük rol oynar.

Bitkiler, normal metabolik yollarında diğerleri arasında flavonoidler, alkaloidler, uçucu yağlar, liganlar, terpenler, terpenoidler, tokoferoller, fenolik asitler, fenolikler, peptitler, çok görevli organik asitlere benzer büyük ikincil metabolit çeşitliliği sağlar. İnsan beslenmesi, antioksidan aktiviteleri barındıran veya yapısal özelliklerine göre ROS'u temizlemesi önerilen bir dizi farklı bileşik içerir. Beslenme ile alınan antioksidanlarının en belirgin temsilcileri şunlardır: C vitamini, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler. Bu moleküller gerek insan gerek de hayvan besinlerinde vazgeçilmez bir parça olduğu düşünülmektedir (Gülçin 2006). Doğal antioksidanlar genellikle fenolik bileşikler olup ve doğal antioksidan madde olarak en önemli gruplar arasında tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitler sayılır.

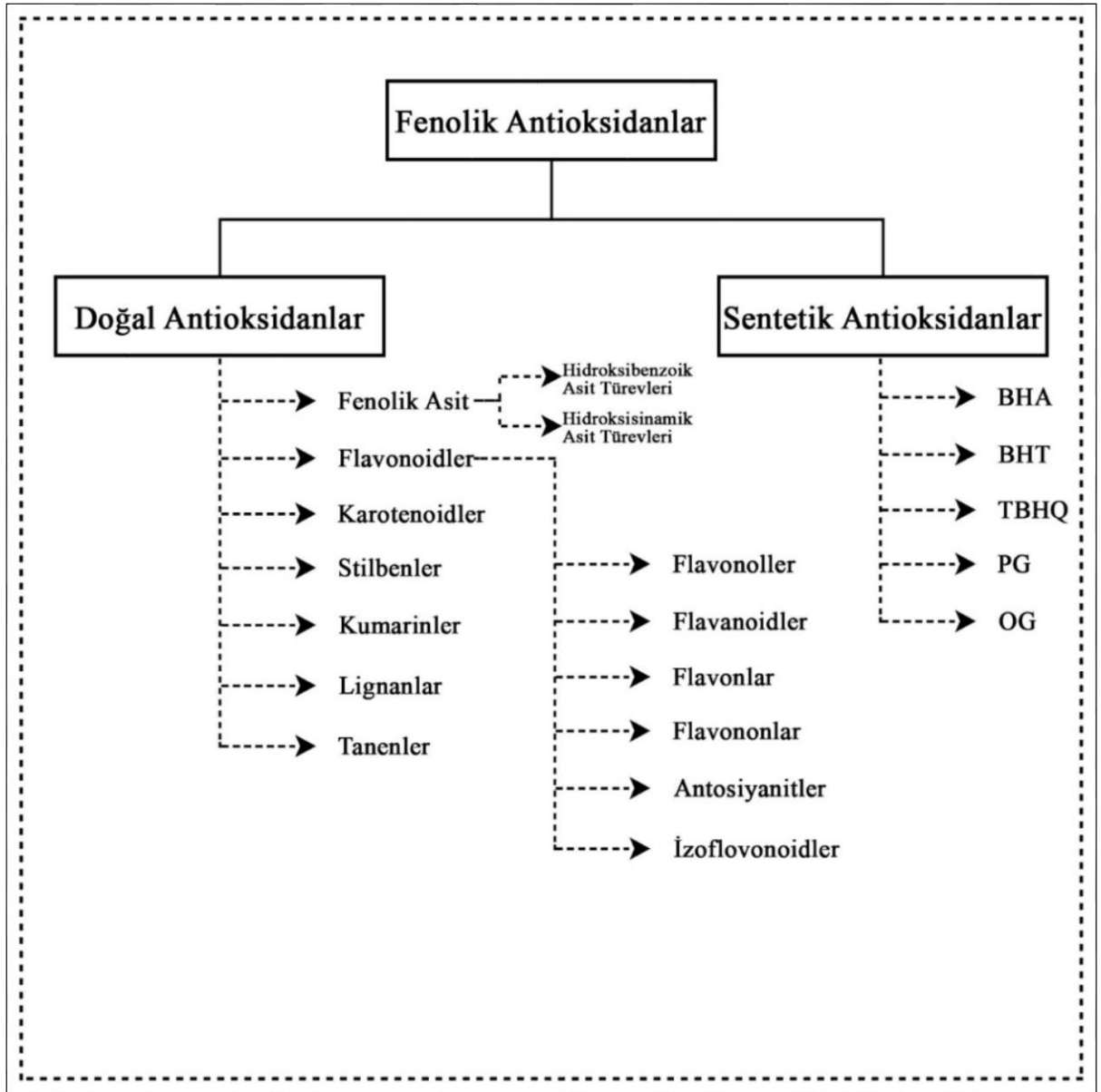
Fenolik Bileşikler

Birer Doğal antioksidanlar olan fenolik bileşikler, bitki kaynaklı maddeler arasında büyük bir yapısal çeşitliliğe ve kimyasal bileşimde farklılıklara sahiptir. Ayrıca bu bileşikler hemen hemen bütün bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvan dokularında bulunurlar (Pokorny 1999, Gülçin, 2020). Çok amaçlı biyoaktif bileşikler olarak görev yaptığı bilinen fenolik bileşikler, bitkilerde bol miktarda bulunurlar. Fenolik bileşiklerin çoğu, insan diyetinin ayrılmaz bir parçasıdır ve ayrıca tıbbi preparatlar olarak da tüketilir. Fenolik bileşiklerin sağlığı koruyucu etkilerinin çoğu, antioksidan, antikanserojenik, antimutajenik,

antimikrobiyal, antienflamatuar ve diğ er biyolojik özelliklerine atfedilmiştir. En yaygın olarak bulunan bitki fenolik bileşikleri arasında fenolik asitler, favonoidler, tanenler, lignanlar ve terpenler bulunmaktadır (Nazck and Shahidi 2006; Shahidi and Ambigaipalan 2015). Fenolik bileşikler, bitki kaynaklı besin ürünleri de dahil hemen hemen bütün bitki  gelerinde doğal olarak bulunan ikincil bitki metabolitleridir. Bu bileşikler insanlarda ve hayvanlarda beslenmenin ayrılmaz bir parçası olduğu düşünülmektedir (Gülçin 2006). Doğal antioksidanlar çoğunlukla fenolik bileşikler olup doğal antioksidan olarak önem arz eden grupları ise tokoferoller, favonoidler ve fenolik asitlerdir (şekil 3).

Fenolik bileşikler bitkilere renk verir ve bitki türlerinin biyokimyasal özelliklerinde temel bir rol oynar (Topal ve ark. 2017). Bitkiler, antioksidan yeteneği de dâhil olmak üzere biyolojik aktiviteye sahip olan fenolikler ile stres gibi birçok olumsuz ve dış etkiye karşı kendilerini korurlar ( ztaşkın). Bu özelliklerinden dolayı fenolik bileşikler insan sağlığı için de önemlidir. Fenolik bileşikler, bitki bazlı gıda ürünleri de dâhil olmak üzere tüm bitkilerin bünyesinde doğal olarak bulunan ikincil bitki metabolitleridir (Giordano *et al.* 2017). Bu bileşikler insan ve hayvan beslenmelerinde önem arz etmektedir. Doğal antioksidanların en önemli grubunu temsil ederler (Gonçalves *et al.* 2017). Bitkilerdeki en yaygın fenolik bileşikler fenolik asitler, tokoferoller ve flavonoidler olarak sınıflandırılabilir (Hannan *et al.* 2016). Fenolik ve flavonoid bileşiklerin, antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral, antitrombotik ve vazodilatör etkiler göstermek ve kanser, kalp problemleri, katarakt, göz bozuklukları ve Alzheimer gibi hastalıkları önlemek için antioksidanlar gibi davranır (Comunian *et al.* 2017, Vodnar *et al.* 2017). Ek olarak, flavonoidlerin belirgin özelliklerinden, oksidatif yolaklı hastalıklara karşı koruma, birçok farklı enzimlerin spesifik reseptörlere bağlanmasını aktive etme veya inhibe etme ve az yoğunluklu lipoproteinlerde oksidasyon miktarını düşürerek kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı koruma özelliklerini içerir (Pietta *et al.* 2000).

Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri, düşük  zk t leli lipoprotein olan kolesterolün oksidasyonunun inhibesinde görev alır (Eberhardt *et al.* 2000). Bu kaynakların doğal oluşu ve biyoaktif bileşikleri, özellikle sağlıksal etkilerde görev alan fenolikler ve flavonoidlerdir (Bocco *et al.* 1998). Bununla beraber Gülçin tarafından son zamanlarda yazılan önemli bir derleme makalesinde antioksidanların sınıflandırılması şekil 1’de gösterildiği şekilde şematize edilmiştir (Gülçin 2020).



Şekil 1. Fenolik antioksidanların sınıflandırılması (Gülçin 2020)

Fenolik asitler bitki kaynaklı gıdalarda ve hemen hemen tüm bitkilerde ve bulunur ve insan beslenmesinin önemli bir yere sahiptir. Bitkilerde Fenolik asitler serbest ve bağlı biçimlerde bulunan besinsel fenoliklerinin yaklaşık %30'unu ihtiva ederler (Robbins 2003). Son zamanlarda fenolik asitlere olan ilgi, meyve ve sebzelerin tüketilmesi yoluyla koroner kalp hastalığı, felç ve kanser gibi oksidatif hasar hastalıklarına (Gülçin ve ark. 2010) ve antiglokoma (Çoban ve ark. 2010) karşı potansiyel koruyucu rollerinden kaynaklanmaktadır. (Sarıkaya ve ark. 2010; Innocenti et al. 2010; Sarıkaya ve ark. 2011).

Bir veya daha fazla aromatik halka içeren çok çeşitli biyolojik açıdan aktif fenolik maddeler, aroma, renk ve yapının çoğunu sağladıkları bitkisel gıdalarda doğal olarak bulunur. Daha basit fenolik maddeler, meyve ve tohumlarda bulunan 3-etilfenol ve 3,4-dimetilfenol gibi tek benzen halkalı monofenolleri, kafeik ve ferulik asit kapsayan hidroksisinamik asit grubunu

ve bunların glikozit bağlarını ve flavonoidleri içerir. Doğal ve sentetik olarak sınıflandırılan antioksidanlardan özellikle çalışma kapsamında kullanılan proantosiyanın ve fikosiyanın moleküllerinin doğal olması sebebiyle bu grubun içerdiği fenolik ve flovonitler üzerinde özellikle durulacaktır.

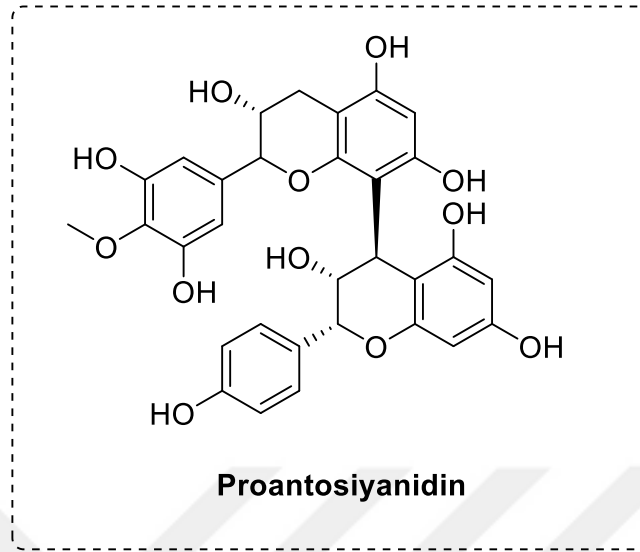
Flavonoidler

Flavonoidler, yaygın olarak bulunan halkalı difenilpropanlardır. Bitkilerde ve özellikle bitkisel gıdalarda bulunur. Kronik hastalıklara karşı çok etkili antioksidan etkiye sahip polifenolik bileşiklerdir. Şimdiye kadar farklı bitki türlerinde 4000'i flavonoid olmak üzere 8000'den fazla polifenolik bileşik tanımlanmıştır ve sayıları artmaya devam etmektedir (Harborne 1999). Bitkilerdeki yaprak, gövde, kök, meyve veya tohum gibi kısımlarında bulunmaktadır. Flavonoidler, birer aromatik amino asit olan fenilalanin ve tirozin ile malonattan elde edilirler. Flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavanonlar ve kalkonları içeren flavonoidler, yüksek bitki dokularında görülür. Flavanonlar, heterosiklik karbon halkasını etkileyen bir dizi dönüşüme uğrayarak antosiyaninler ve kateşinlerin oluşmasına yol açar. Flavonoid türevleri, heterosiklik oksijen halkası etrafındaki yapılarında değişiklik gösterir, ancak hepsi karakteristik C6–C3–C6 karbon iskeletine sahiptir (Gülçin ve ark .2011; Gülçin 2012).

Proantosiyanidin

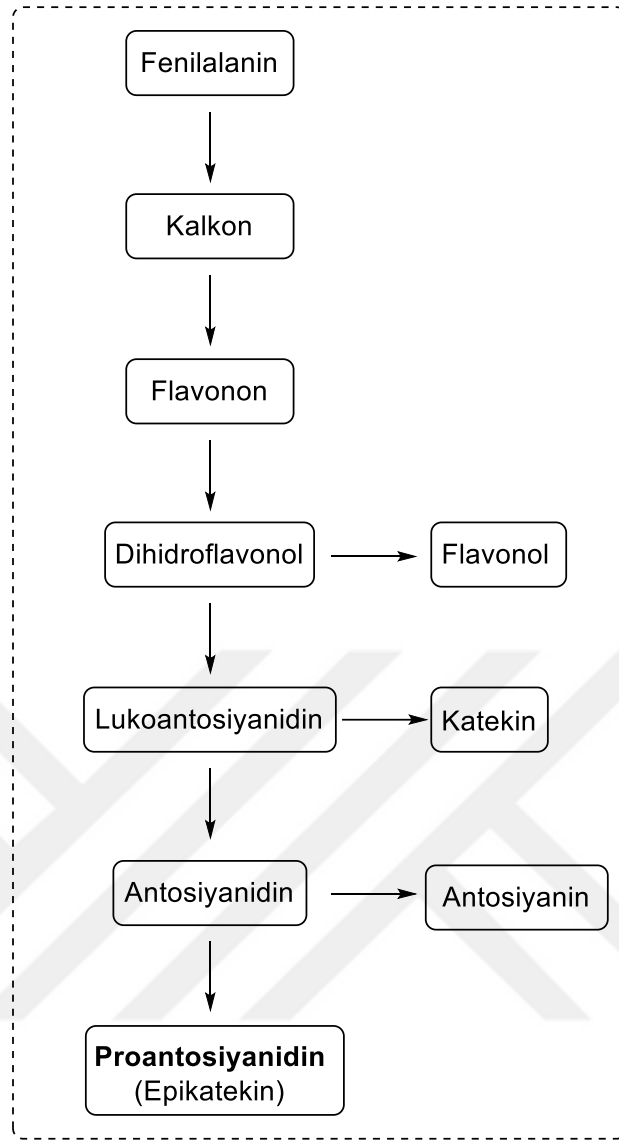
Proantosiyanidin, bitkide bulunan bir tür fenolik üründür (oligonoller, kateşin tipi monomerler, dimerler ve trimerler ile oligomerik proantosiyanidinlerdir). Deneysel ve klinik çalışmalar, proantosiyanidin, güçlü anti-inflamatuar ve antioksidan etki dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Wang *et al.* 2017). Bitki polifenoller arasında proantosiyanidinler, hipertansiyon, alerji, enfeksiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve çeşitli enfeksiyonlar gibi birden fazla insan rahatsızlığının gelişimi ile ilgili yaşlanma önleyici etkileri ve önleyici özellikleri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Öte yandan, radyoetiketli monomerik flavan-3-ols ve proantosiyanidin dimerleri ve trimerlerinin, insan kaynaklı bir kolonik karsinom hücresi tabakasından kolaylıkla taşınabileceği bildirilmiştir (Deprez *et al.* 2001). Bir dimer olan ve kakaoda bol miktarda bulunan prosiyanidin B-2, tüketildikten sonra Flavan-3-ol insan plazmasında kolayca saptanabilmiştir (Holt *et al.* 2002). Ayrıca proantosiyanidin oligomerlerinin, flavan3-ol monomerlerinden ve polimerlerinden çok daha güçlü biyoaktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Mao *et al.* 2002; Youdim *et al.* 2004; Manach *et al.* 2004; Erleymen *et al.* 2004). Son zamanlarda, yapılan çok sayıda çalışmada, üzüm çekirdeği ekstresindeki proantosiyanidin'in güçlü antiinflamatuar aktiviteye sahip olduğunu ve

duygu durum bozuklukları ve Alzheimer hastalığı gibi bazı nöroinflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir terapötik ajan olacağını kanıtlamıştır (Aruoma *et al.* 2006; Mazzio *et al.* 1998; Xu *et al.* 2005).



Şekil 2.Proantosiyanidin molekül formülü

Proantosiyanidinler, merkezi fenilpropanoid yoldan başlayan flavonoid metabolik yolların oligomerik veya polimerik son ürünleridir. Yoğunlaştırılmış tanenler olarak da bilinen proantosiyanidinler, flavonoid metabolizmasının oligomerik veya polimerik son ürünleri veya merkezi fenilpropanoid yolağının başlayan antosiyanidin biyosentez yolunun bir dalının ürünleridir (Lepiniec *et al.* 2006). Proanto-siyanidinler, çok çeşitli bitkilerin tohumlarında veya testalarında, meyvelerinde, kabuklarında ve yapraklarında bulunur. Bu bileşikler kahverengi pigmentasyon sağlar, bitkiyi ultraviyole (UV)-B, patojenler ve ayrıca böcek saldırısından korur ve bitkinin otçullara karşı direncini artırır (Xie *et al.* 2005). Proantosiyanidinlerin metal iyonlarına bağlanma kabiliyeti, proantosiyanidin biyosentezinin geliştirilmesinde potansiyel olarak ciddi bir problem teşkil eden demir ve çinko gibi temel mikro besinlerin biyoemilim ve biyoaktivitesini azaltır ve stres direncini ve sağlıklı beslenmeyi geliştirmek için bir hedef haline getirmektedir (Xie *et al.* 2005). Şekil 3'te görüldüğü gibi flavonoid biyosentez yolu içinde, proantosiyanidinler, fenilalanin'in antosiyanidine dönüşümü için antosiyaninlerle ortak bir biyosentetik yolu paylaşır. Antosiyaninler ve proantosiyanidinler, farklı enzimler tarafından aynı öncül antosiyanidin'den türetilir (Shao *et al.* 2003; Tohge *et al.* 2005).



Şekil 3. Proantosiyanidin'in (epikatekin) biyosentetik yolu

Yapılan çalışmalarda proantosiyanidin (epikatekin) 'in antioksidan özellik de dahil olmak üzere kalp koruyucu, lipid giderici, anti-obezitik, antidiyabetik ve antimikrobiyal özellikler olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu bilinmektedir.

Oksidatif stres, günlük normal fiziksel aktivite esnasında meydana gelen hücresel hasarın birincil nedenidir. Bu bağlamda, hücresel hasar ve oksidatif stresin sebep olduğu bazı metabolik bozukluklara, antioksidanlar kullanılarak etkin bir şekilde yön verilebilir. Antioksidan bileşikler, serbest radikallerin hasarlarını azaltarak veya tamamen gidererek oksidatif strese karşı koruyucu etki sağlar (Iahtisham-Ul-Haq *et al.* 2019, Durmaz *et al.* 2022). Bu şekilde hücresel bileşenleri oksidatif hasarlardan korur (Topal ve Gulçin, 2022). Proantosiyanidinlerin önemli antioksidan kapasitelere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Lai and Xian, 2018). Kanseri, doğrudan indüklenebilen kontrolsüz hücre büyümesidir. Kanseri, antioksidan besinler kullanılarak kontrol edilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca

proantosiyamidinlerin tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Kalp fonksiyonu, diğer nedenlerin yanı sıra arter tonisite kaybı, plak birikimi, kireçlenme veya viskoz kandan etkilenebilir. Proantosiyamidinler damar gevşetmesi yoluyla kardiyovasküler hastalıkları ve LDL oksidasyonunun inhibe ettikleri bildirilmiştir (De la Iglesia *et al.* 2010, Kruger *et al.* 2014) Proantosiyamidinler, oksitlenmiş LDL'nin, arterioskleroz oluşumunda rol oynayan lektin benzeri oksitlenmiş LDL reseptörüne bağlanmasını inhibe edebilir (Mizuno *et al.*, 2017). Proantosiyamidin, endotelial NO salınımını ve ardından vasküler düz kas hücrelerinde c-GMP seviyelerindeki artışı içeren endotel bağımlı gevşetici aktivitede de yer alır (Fitzpatrick *et al.* 2002). Dokunun yeteri kadar kan alamaması sonucu oluşan tahribatı da azaltır. Dopaminerjik hücre ölümü Parkinson hastalığına yol açtığından, proantosiyamidin açısından zengin bir beslenme ile hücre ölümü azaltılabilir. Yüksek karbohidratlı ve yağlı yiyeceklerin diyet ile alınması, hiperglisemi ile sonuçlanabilir (Lacroix *et al.* 2012).

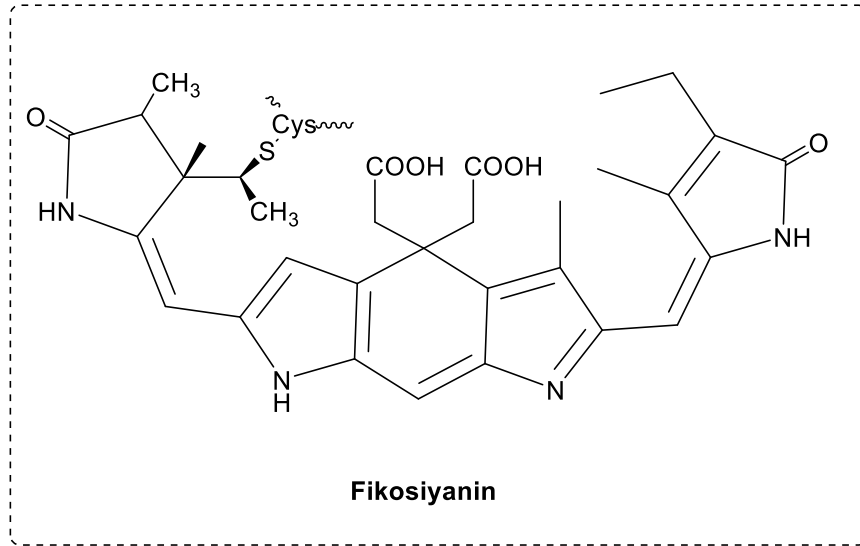
Proantosiyamidinler beslenmeye bağlı metabolik bozuklukları iyileştirebilir. Obezite metabolik bozukluğun bir sonucudur ve obezite başka rahatsızlıkları sebebiyet vermektedir. Proantosiyamidinler obezitenin zararlı etkilerini azaltmaktadır. Diyabet, glukoz metabolizmasının bozulduğu kronik bir metabolik hastalıktır. Ana sebebi pankreas bezindeki toksisiteden ve bunun sonucunda insülin seviyesindeki eksiklikten kaynaklanır (Bora *et al.* 2022). Şiddetli diyabetik bir süreç nöropati, retinopati veya nefropati ile sonuçlanabilir. Tedavisi, sindirim enzimlerinin inhibisyonu ile sağlanmaktadır (Özaslan *et al.* 2022). Bunun yanı sıra proantosiyamidinler kullanılarak normal insülin direncini ve diyabetik pankreas adacıklarındaki apoptotik hücre sayısını azalttığı bilinmektedir (Ding *et al.* 2013; Xiu *et al.* 2014). Endoplazmik retikulum stresi yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur ve kalsiyum homeostazını değiştirir. Endoplazmik retikulum stresi diyabetik durumda açılır. Proantosiyamidin tedavisi, endoplazmik retikulum stresini kısmen azalttığı bildirilmiştir (Sundar Rajan *et al.* 2007).

Proantosiyamidin'in de dahil olduğu polifenoller önemli antimikrobiyal özelliklere sahip doğal maddeler olduklarından dolayı son zamanlarda popülerlik kazanmaktadırlar. Yeni doğal antimikrobiyal ajanlar, mikroplarda dirençli antibiyotiklerin gelişmesi ve uyumlu farmasötik antibiyotiklerin yaygın olarak ilan edilen yan etkilerini azaltması nedeniyle tercih edilmektedir (Daglia, 2012). Bu bağlamda, proantosiyamidin dimerlerinin güçlü antimikrobiyal ajanlar olduğu saptanmıştır (Karioti *et al.* 2011; Zang *et al.* 2013). Bunar aynı zamanda *Escherichia coli* ve *Streptococcus utans* da dâhil olmak üzere idrar ve dış enfeksiyonlarında bakterilere karşı yapışmayı önleyici etkilerde sahiptirler. Bu bağlamda proantosiyamidin, üropatojenik *E. coli*'nin çoklu ilaca dirençli suşlarına karşı yapışma önleyici özellik göstermektedir. İshalli çocuklara

çeşitli bitkilerden elde edilen proantosiyanın verildiği ve pozitif sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Ravindranathan *et al.* 2018).

Fikosiyanin

Fikosiyanin, doğal bir mavi renklendirici olarak gıdalardaki uygulamalar için güçlü bir potansiyel gösteren çözünür, mavi renkli bir proteindir (Zang *et al.* 2020). Fikosiyanin; kokusuz, toksik olmayan, suda çözülebilen, antioksidan etkiye sahip ve güçlü floresan özelliğe sahip, mavi renkli bir toz olup ve ticari adı "lina mavisi" olan bir pigmenttir. Doğal dünyada mavi renkli metabolitlerin azlığı, C-phycocyanin'i gıda endüstrisinde mavi renk için sınırlı seçeneklerden biri haline getirmiştir (Newsome *et al.* 2014). Ayrıca fikosiyanin ışık enerjisini verimli bir şekilde yakalayabilen bir tür fotosentetiğe yardımcı olan bir ajandır. Fikobiliprotein, ışık enerjisini yardımcı olarak toplayan bir supramoleküler protein kompleksi olan fikobilizomun bileşenlerinden biridir (Yan *et al.* 2014). Fikobilizom, fotosentez enerji Emilimi ve iletiminde önemli bir rol oynar. Siyanobakterilerde yüksek miktarda bulunan ve ekonomik anlamda en önemli fikobiliprotein çeşididir. Bu pigment ışığa olan hassasiyeti ile bilinmektedir. Bu sebeple pigmentin rengini kaybetmemesi için ürünün ışıktan korunması önemlidir. Bu nedenle denizel doğal ürünler son yıllarda önemli bir gelişme ve kullanıma sahiptir. Ayrıca deniz ürünlerinde *Spirulina sp.*, *Phormidium sp.*, *Lyngbya sp.*, *Synechocystis sp.* ve *Synechococcus sp.* antioksidan için bileşiklerinin en önemli kaynaklarından biri haline gelmiştir. Geçtiğimiz yıllarda, doğal ürünler, hastalıkların kimyasal etkilerini önleme ve tedavisinin uygulanması için giderek daha önemli hale geldi. Fikosiyanin, gök mavisi renginde olan ve gıda katkı maddeleri, sağlık gıdaları, kozmetikler ve farmasötiklerin etkili bir bileşeni olarak kullanılabilen fikobiliproteinlerden biridir (Eriksen, 2008). Gıda veya gıda takviyelerinden elde edilen doğal ürünler, hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılabilir ve bunların kimyasal etkilerini önleme ve kemoterapi etkileri tam olarak incelenmiştir. Fikosiyanin, kanser hücre döngüsü ilerlemesini etkileyerek hücre döngüsü durmasına neden olabilir. Fikosiyaninin anti-inflamatuar etkisi üzerine deneysel çalışmalar dünya çapında yaygın olarak yapılmıştır. (Huang *et al.* 2002), selenyum fikosiyaninin karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen akut karaciğer hasarı üzerindeki negatif etkisini gözlemledi.



Şekil 4. Fikosiyanin yapısı. Fikosiyanin alt birimlerinin her biri bir polipeptit zinciri ve bir (α -alt birimi) veya iki (β -alt birimi) kromoforefikobilin içerir. Polipeptit zinciri ile kromofor arasındaki bağlantı tiyoester bağıdır

Fikosiyanin, hidroksil ve hidrojen peroksit içermeyen radikal ve reaktif oksijen türlerini temizleyen önemli bir antioksidan etkiye sahiptir (Bhat and Madyastha, 2000; Romay *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2003; Lu *et al.* 2006). Bu arada, antioksidatif aktivite, anti-inflamatuar ve antitümör etkisinin bir temelidir (Halliwell, 1990; Romay *et al.* 1998). Fikosiyanin, hasarlı hücrelerde üretilen serbest radikalleri giderebilir ve bu serbest radikallerin neden olduğu oksidatif DNA hasarını da önleyebilir. Eğer asarlı DNA'lar zamanında tamir edilemezlerse ve bir miktar birikir ve bunun sonucunda hücre apoptoz programı başlayacak ve hücre apoptozisini indükleyecektir (Rimbau *et al.* 1999, 2001). Fikosiyanin, oksidatif stresin neden olduğu bir reaksiyon olan tümör nekroz faktörünü (TNF) de kaldırabilir (Romay *et al.* 2001). Diğer bir çalışmada Zhang ve arkadaşları (1996a), farelere 50 mg/kg fikosiyanin enjekte edildiğinde ve öldürücü dozda ^{60}Co ışını ile ışınlığında, farelerin hayatta kalma oranının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %28 oranında arttığını bulmuştur. Ayrıca yazarlar, fikosiyaninin ışınlanmış farelerin granülopoezis progenitör hücrelerinin ve hematopoietik kök hücrelerinin oluşumunu uyarabileceğini, çekirdekli kemik iliği hücrelerinin sayısını ve farelerin toplam periferik kan hücrelerinin sayısını artırabileceğini, ancak periferik kırmızı kan hücreleri ve hemoglobin sayısı üzerinde önemli bir etkisi olmayabileceğini bulmuşlardır. Romay *et al.* (2003), fikosiyaninin alkali temizleyebileceğini gösterdi, hidroksil ve peroksit, Fe^{2+} nin neden olduğu mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Bu oksidatif fonksiyon, TNF-a ve NO oluşumu ile ilgili olduğu söylenmiştir. Ayrıca Bhat ve Madyastha (2001) fikosiyanin'in ONOO $^-$ 'yi iderdiğini ve bu durumun renk üreten gruplarla alakalı olduğunu bildirmişlerdir (Yu *et al.* 2017).

Sentetik antioksidan maddeler

Sentetik antioksidanlar, sıvı ve katı yağların ve lipid içeren gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında lipid oksidasyonunu engellemek veya oksidasyon süresini uzatmak maksatlı ürünlere ilave edilmektedir. Bu amaçla yaklaşık 70 yıldır gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerinin okside olmasını kontrol etmede en çok kullanılan sentetik antioksidan BHA ve BHT'dir. Bunun yanı sıra BHT molekülü, BHA'dan daha fazla sterik engel gösteren iki tert-butil grubunun varlığından dolayı BHA kadar etkili değildir (Nanditha and Prabhasankar 2009). Gıda katkı maddesi olarak kullanılan BHA'nın antikanserojen özellik sergilediği bilinmektedir (Shahidi ve Wanasundara 1992). BHA ve BHT, ısınmaya karşı oldukça karardır ve genellikle fırınlanmış ve kızartılmış ürünlerdeki yağların stabilizasyonu için kullanılır (Kulawik *et al.* 2013; Anraku *et al.* 2018). TBHQ, birçok yenilebilir hayvansal yağlar, doymamış bitkisel yağlar ve et ürünleri için oldukça etkili bir koruyucudur. Tazeliğini, ürünlerin tadını, besleyici değerini, rengini korur ve stabilize eder. Demir varlığında dahi renk bozulmasına neden olmaz (Kashanian and Dolatabadi 2009). Sentetik antioksidanlar arasında TBHQ'nun BHA ve BHT'den daha etkili olduğu daha çok kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanlar hakkında ciddi güvenlik endişeleri bulunmaktadır. Farklı gıda katkı maddeleri arasında BHA, TBHQ ve PG'nin nükleik asit yapısı ile moleküler kompleks yapılar türetme ve DNA'daki ikili sarmal yapıya hasar verme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Dolatabadi and Kashanian 2010). Dünyanın birçok yerinde sentetik antioksidanların potansiyel toksisite etkileri nedeniyle, gıda maddelerinde kullanımlarını sıkı bir şekilde düzenlemektedir. Güvenlik endişeleri nedeniyle, sentetik antioksidanların gıda koruyucuları olarak kullanımı sınırlıdır (Biparva *et al.* 2012; Shahidi ve Ambigaipalan 2015; Gülçin, 2020). Özellikle gıda endüstrisinde de sentetik antioksidanlar yani BHT, BHA gibi antioksidanlar kullanılmaktadır. Son zamanlarda sentetik antioksidanların olası toksik etkisinden ötürü doğal antioksidanların önemi artmıştır (Gülçin *ve ark.* 2006; Gülçin 2008).

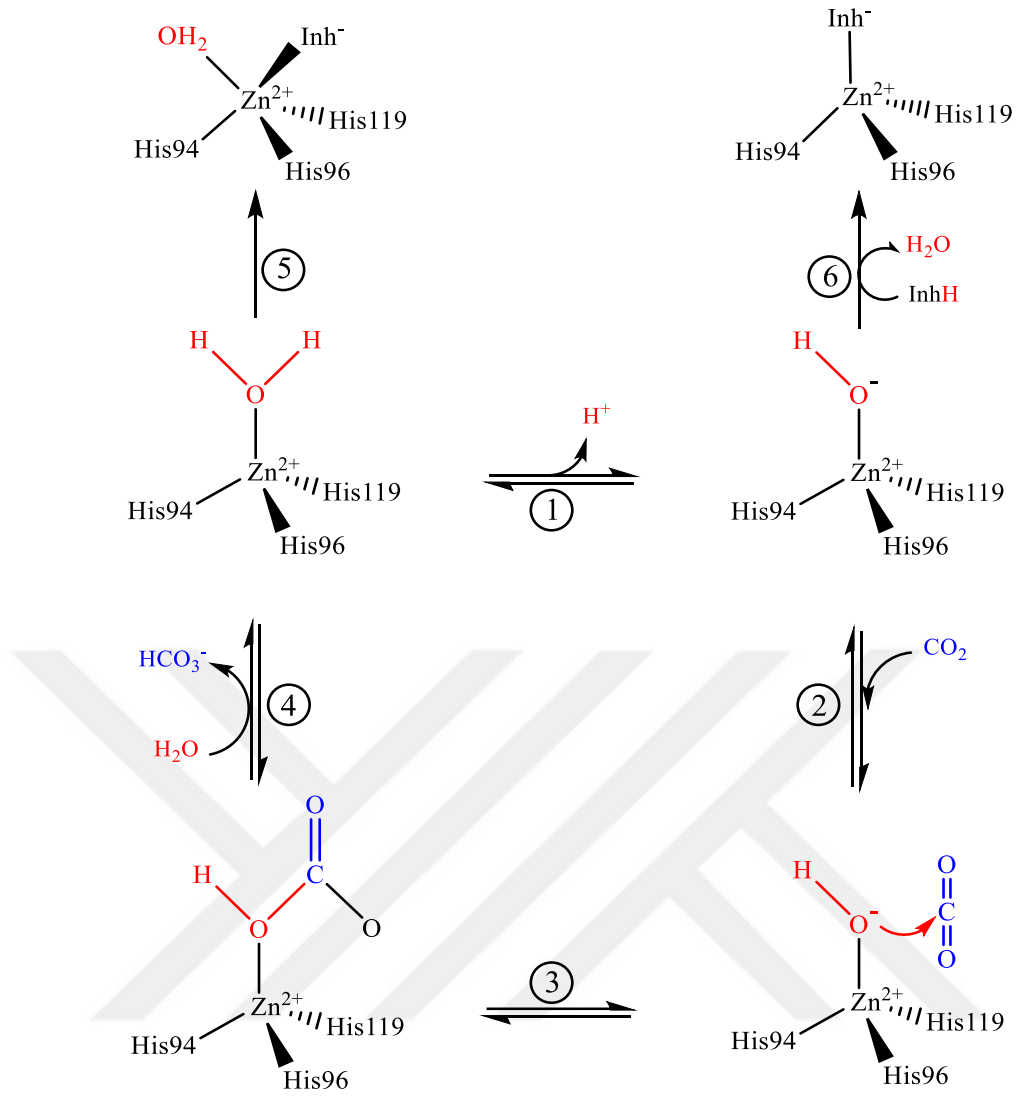
Enzimler

Canlı organizmalardaki kimyasal bir tepkimede hiçbir değişmeye uğramadan, hiçbir yan ürün oluşturmeyen ve tam ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Enzimler, genellikle protein yapılıdır ve son derece spesifiktirler. Enzim ile tepkimelere giren moleküllere substrat denilmektedir. Enzim bunları farklı moleküllere yani ürünlere dönüştürür. Enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı temel sınıfa ayrılmıştır. Enzimler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan

biri ise enzim inhibisyonudur. Enzimlerin inhibe olması, enzimlerde hem *in vivo* yani canlı içi hem de *in vitro* yani canlı dışında da aktivitelerinin bazı bileşikler sayesinde azaltılması ya da yok olmasıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidrazlar (CA), karbon dioksitin (CO_2) proton ve bikarbonata (HCO_3^-) geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden ve Zn^{2+} içeren metalloenzimlerdir (Yiğit B ve ark. 2018). CA'lar α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve t-CA alt aileleri dahil olmak üzere sekiz farklı alt bölümde sınıflandırılmıştır (Bora ve ark. 2022). Bunlar arasında α -CA'lar tüm memelilerde ve omurgalılarda bulunur. α -CA'lar, enzimin aktif bölgesinde, histidin kalıntıları ile koordineli bir Zn^{2+} iyonu ve bozuk bir tetrahedral yapıda bir $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ içeren on altı farklı izoform içerir. CA izoenzimlerinin saflaştırılması hayvan dokularından gerçekleştirilmiştir. CA ilk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır (Supuran and Scozzafava 2001). Ayrıca, izoenzimlere bağlı olarak farklı izolasyon metotları yapılmaktadır. Üzerinde en çok bilimsel çalışma yapılan izoenzimlerin başında sitoplazmik CA I ve CA II gelmektedir. Bu iki izoenzim eritrositlerden elde kolaylıkla elde edilebilmektedir. Yapılan deneylerde eritrositlerde yüksek miktarda bulunan hemoglobinin, kloroform-etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi veya ısıyla denatüre yöntemleriyle uzaklaştırılabilmiştir. CO_2 alyuvarlara difüze olduğunda, alyuvarlar da mevcut olan CA ile CO_2 süratle metabolize olarak proton (H^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarına ayrılarak yeniden kana aktarılır. Kanın asit-baz dengesi yani pH'sı 7,4'te sabitlemeye çalışarak organik bir tampon çözeltiye benzer iş görür. Bitki CA'sı ile çalışmalarda yapılmıştır. Bunun sonucunda hayvan ve bitki CA'sı arasında farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. CA enzimi suda yaşayan canlılar, mantarlar, bitkiler, böcekler ve memelilerde bulunmaktadır. CA enzimi eritrositlerde de bol miktarda bulunan bir enzimdir. Fizyolojik pH kontrolü, fotosentez, kireçlenme gaz dengesi ve benzeri olaylarda kilit görevini görmektedir (Gülçin ve ark. 2004). Karbonik anhidraz enziminin etki ve inhibisyon mekanizmaları Şekil 5'e verilmiştir.

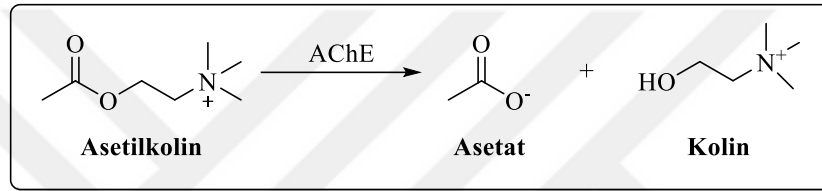


Şekil 5. Karbonik anhidraz enziminin etki ve inhibisyon mekanizmaları

Asetazolamid, metazolamid, etokszolamid, diklorfenamid, dorzolamid ve brinzolamid yaygın olarak kullanılan CA izoenzim inhibitörleridir. Topikal CA inhibitörleri (CAI'ler), dorzolamidin onaylandığı 1995 yılından bu yana glokomun tıbbi tedavisi için kullanılmaktadır (Tham YC, Li X). 2000 yılında, ikinci bir CA inhibitörü olan brinzolamid, Avrupa'nın çoğunda kullanılabilir hale geldi. Bu amaçla asetazolamid, metazolamid, sülfonamid, diklorfenamid, brinzolamid, etokszolamid, dorzolamid, furosemid, zonisamid, bumetanid ve indapamid, klinik olarak kullanılan güçlü CA inhibitörleridir. Glokomun dünya çapında körlüğün önde gelen nedeni olduğu bilinmektedir. Glukom, geri dönüşü olmayan körlüğe ve görme bozukluğuna neden olan çok faktörlü optik nöropatilerin heterojen bir grubudur. Ayrıca dünya çapında glokom hastalarının sayısının 2040 yılına kadar 112 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Wang J.).Glokom, sonunda geri dönüşü olmayan periferik görme kaybına ve sonunda körlüğe sebebiyet veren yüksek göz içi basıncı (GİB) ile karakterize bir oftalmolojik bozukluktur (Hou Z. 2020/D'Ascenzio M. 2017 / /De Monte C.2015).

Asetilkolinesteraz

Demans, dünyada hızla yayılan küresel ve etkili bir nörodejeneratif hastalıktır. Ayrıca Alzheimer hastalığı (AH), günümüzde yaşlılar arasında en sık görülen demans formudur ve günlük aktivite ve ihtiyaçlarını yerine getirme yeteneklerini olumsuz etkiler. Nörodejeneratif bir hastalık olarak AD, merkezi sinir sistemindeki nöronların kaybına bağlı olarak yavaş ilerleme ve fonksiyonel bozulma olarak tanımlanır (Yiğit ve ark. 2020; Polat Köse ve ark. 2020). AD'nin patofizyolojisinin daha çok bir nörotransmitter olarak asetilkolin (ACh) tüketimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Asetilkolinesteraz (AChE) karboksilesteraz enzim sınıfına ait olup, kolinerjik açıdan önemli bir role sahiptir. ACh'yi kolin ve asetata hidrolize eden biyolojik olarak önemli bir enzimdir. AChE (Garibov *et al.* 2016). Asetilkolin'in AChE enzimi katalizörlüğünde asetat ve koline hidrolizdiği reaksiyon Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Asetilkolin'in AChE enzimi katalizörlüğünde asetat ve koline hidrolizi

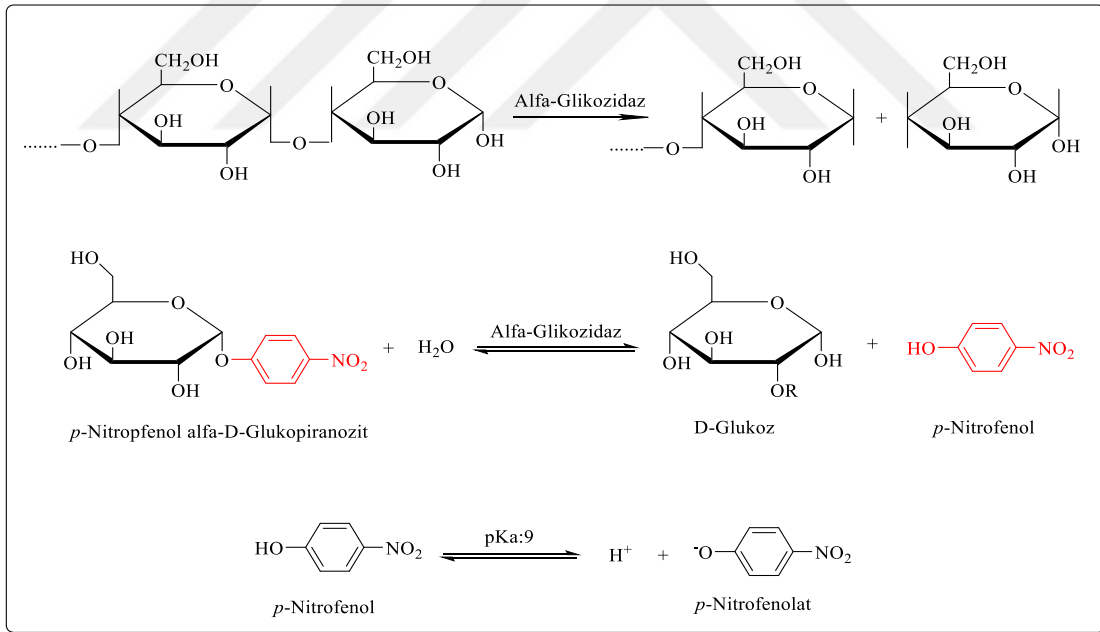
Bu enzim nörotransmitterler olan asetilkolini (ACh) asetata hidrolize eder. Ayrıca AChE, insan vücudunun her yerinde, özellikle kan serumunda, pankreasta, karaciğerde ve merkezi sinir sisteminde (CNS) çeşitli ChE türlerini hidrolize eder (Taslimi *et al.* 2018a). Eritrosit zarlarında, sinirlerde, kaslarda, CNS'de, motor ve duyuşal liflerde, periferik dokularda ve kolinerjik ve kolinerjik olmayan liflerde bulunur. AChE inhibitörleri, kolinesteraz enziminin ACh'yi parçalamasını önleyerek nörotransmitter ACh'nin hem etkisini hem de süresini artırır (Taslimi *et al.* 2018b). AD tedavisinde en önemli yaklaşımlardan biri AChE inhibitörlerinin (AChEI'ler) kullanılmasıdır. Bu nedenle, kolinerjik enzimin seçici inhibitörleri, yaygın nörodejeneratif hastalıklara karşı ilaç tasarımı büyük öneme sahiptir. Asetilkolin miktarının azalması Alzheimer hastalığı başta olmak üzere birçok hastalığa ev sahipliği yapar. Bu yüzden AChE miktarını düşürmeye inhibe etmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Asetilkolinesteraz enzimi bir polifenol olan biberiyede bulunan ayrıca antioksidan özelliği taşıyan rosmarinik asit AChE aktivitesini azaltmıştır (Gülçin *et al.* 2016).

Kolinesterazları inhibe eden maddeler, bir nörotransmitter olan asetilkolin'in hidrolizini katalizlemektedir. Vücutta kolinesteraz enzimlerinden asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri olarak iki tane enzim bulunmaktadır. Asetilkolinesterazı inhibisyona uğratan ilaçlara kolinesteraz inhibitörleri ya da antikolinesterazlar denir. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın parçalanmasını inhibisyona uğratarak santral ve periferik kolinerjik

fonksiyonu güçlendirmektedir. Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak Myastenia, glokom, Gravis ve Alzheimer Hastalığı gibi hastalıklarda kullanılmaktadır (Göçer ve ark. 2013). Asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde ki değişiklikler yaşam kalitesi açısından büyük öneme sahiptir. AChE enzimi inhibitörleri genel olarak Alzheimer hastalığında diğer hastalıklar olarak Parkinson hastalığında, otizm, şizofreni hastalıklarında tedavi etkisi yaratmaktadır. Karbonik anhidraz aktivitesi farkları ise şeker hastalığı başta olmak üzere birçok hastalığa sebep olmaktadır (Beydemir ve ark 2004).

α -Glukozidaz enzimi

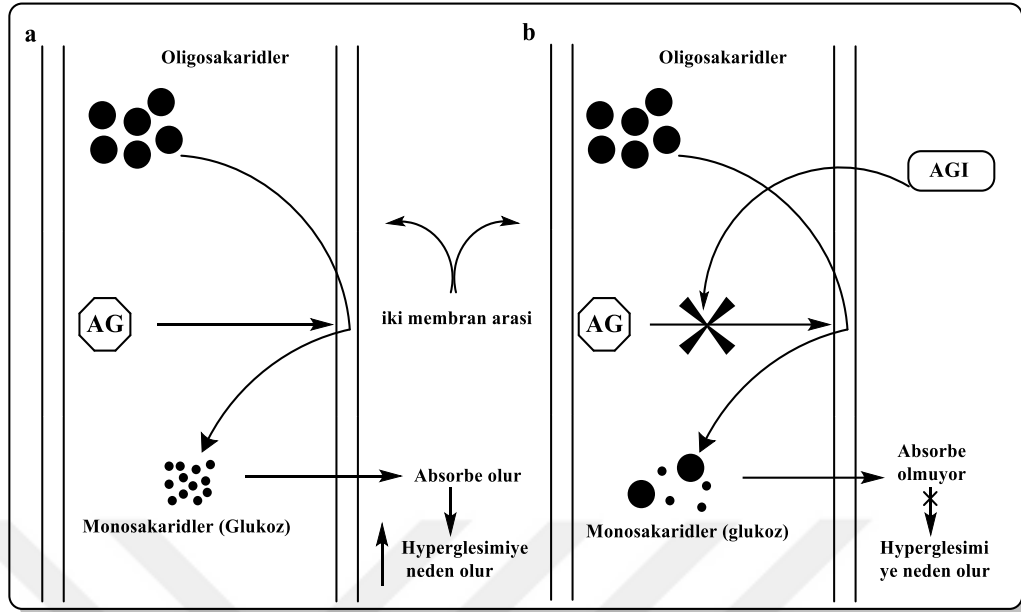
α -Glukozidaz, önemli bir karbonhidrat hidrolaz olarak, oligosakkaritler ve disakkaritleri glukozla dönüştürme sürecinde anahtar rol oynar. Üretilen monosakarit, ince bağırsak tarafından emilebilir, bu da kan glukoz seviyelerinde bir artışa yol açar (Lee *et al.* 2016). Kompleks karbohidratların parçalanmasından sorumlu olan α -glukozidaz enzimleri ince barsağın fırçamsı yüzeyinde bulunurlar. α -glukozidaz türevi enzimler oligosakkarik ve disakkaridleri monosakkarik boyutuna kadar parçalarlar. α -Glukozidaz'ın bir polisakkariti glukoz birimlerine kadar hidrolizlediği reaksiyon Şekil 7'de özetlenmiştir.



Şekil 7. α -Glikozidaz enziminin metabolizmadaki etki mekanizması

Monosakkaridler barsaklardan rahatça emilip kana karışırlar. α -glukozidaz inhibitörleri (AGI'ler), tip 2 Diabetes Mellitus'un (DM) tedavisi için kullanılmış bir ilaç sınıfıdır. Şu anda, AGI'ler beslenmesi zayıf olan tip 2 DM hastalarının tedavisi için birinci basamak ilaçlar ve ayrıca insülin tedavisi alan tip 1 DM hastaları için tercih edilen ilaç etkeni olarak kullanılmaktadır (De Melo *et al.* 2006). AGI'ler, polisakkaritlerin glukozla ve ilgili

monosakkaritlere hidrolizini önleyerek glukoz seviyelerini azaltabilir, bu da daha sonra sindirim sisteminde karbonhidratların emilimini azaltır (Casirola *et al.* 2006).



Şekil 8. α-Glikozidaz enzimi için inhibe olma mekanizması (Taslimi and Gülçin 2017)

α-Amilaz enzimi

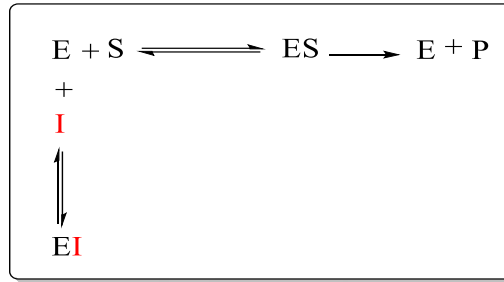
α-Amilaz (E.C.3.2.1.1) nişastanın maltoz, maltotrioz ve az miktarda glikoza hidrolizinden sorumlu anahtar bir enzimdir. Amilazlar, nişastadaki glikozidik bağları glikoz, maltoz, maltotrioz ve dekstrine hidrolize eden sindirim enzimleridir. α-amilazlar, kalsiyum yokluğunda tamamen işlev göremeyen kalsiyum metalloenzimleridir. α-amilaz, nişasta zinciri boyunca herhangi bir konumda hareket ederek uzun zincirli karbonhidratları parçalar. Sonucunda amilozdan maltotrioz ve maltoz veya maltoz, glikoz üretir. İnsan fizyolojisinde hem tükürük hem de pankreas amilazları α-Amilazlardır. Ayrıca bitkilerde, mantarlarda (Ascomycetes ve Basidiomycetes) ve bakterilerde (Bacillus) bulunur (Singh *et al.* 2011).

Enzim inhibisyonu

Enzimlerin in vitro aynı zamanda in vivo olarak çalışma düzeyini bazı maddeler veya bileşikler vasıtasıyla azaltılması ya da son bulması enzim inhibisyonu denilmektedir. Bunu yapan maddelere veya bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörlerin birçoğu düşük molekül ağırlığı olan bileşikler veya iyonlardır. Örneğin ilaçlar ve toksik moleküller enzimleri inhibe etme olasılığı vardır. Enzim inhibisyonu, enzimlerin nüfuz etkileri ile metabolik yollara ışık tutması biyokimyacılar için ehemmiyetlidir (Keha ve Küfrevioğlu 2020). Enzimlerin inhibe olayı iki temel başlıkta incelenir. Bunlar; geri dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyonudur. Geri dönüşümlü inhibe olayında, inhibitör madde ortamdan elemine edildiğinde enzim aktivitesini yani çalışma özelliğini tekrar kazanmaktadır.

Yarışmalı (Kompetitif) inhibisyon

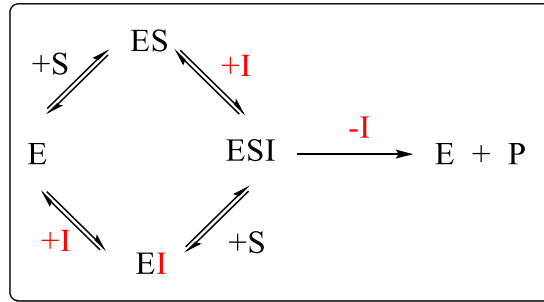
Yarışmalı inhibisyonda inhibe eden madde enzimde bulunan aktif bölgeye bağlanmak için substrat ile yarışmaktadır. Bu kimyasal moleküller yapı olarak substrata benzeseler de enzim tarafından ürün oluşturamamaktadır. Bu inhibisyonda substrat miktarı artırılırsa inhibitör madde işini yapamaz ve enzime bağlanamaz. Enzimin V_{max} değeri değişmez. (Bekpinar ve ark. 2015; Keha ve Küfrevioğlu 2020).



Şekil 9. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif) gösterimi

Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon

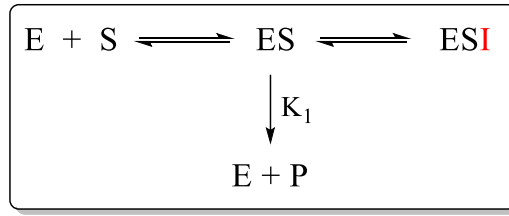
Bu tarz inhibisyonlar da inhibitör madde substrat ile yapı olarak benzemez. Bu sebepten dolayı enzimin aktif bölgesine değil de enzimin başka bir bölgesine bağlanır. Substrat miktarının çoğaltılması inhibisyonu değiştirmez. Yarışmasız inhibisyonda inhibitörün gücü turnover sayısını azaltarak gösterilir ve enzimin V_{max} değeri düşerken K_m değeri stabil kalır (Bekpinar ve ark. 2015; Keha ve Küfrevioğlu 2020).



Şekil 10. Yarışmasız (Nonkompetitif) inhibisyon gösterimi

Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyon

Yarı yarışmalı (Unkompetitif) inhibisyonda ise inhibitör madde enzimin aktif bölgesine bağlanmak yerine enzim-substrat kompleksine bağlanmaktadır. Substrat miktarı artırılırsa inhibisyon artmaktadır. Bu inhibisyon çeşidinde tek substratlı değil de çift substratlı reaksiyonlar daha çok görülür. Bu inhibisyonda ortamdan ES kompleksi uzaklaştığı için K_m azalır ve ESI kompleksinin miktarı arttığı içinde V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2020).



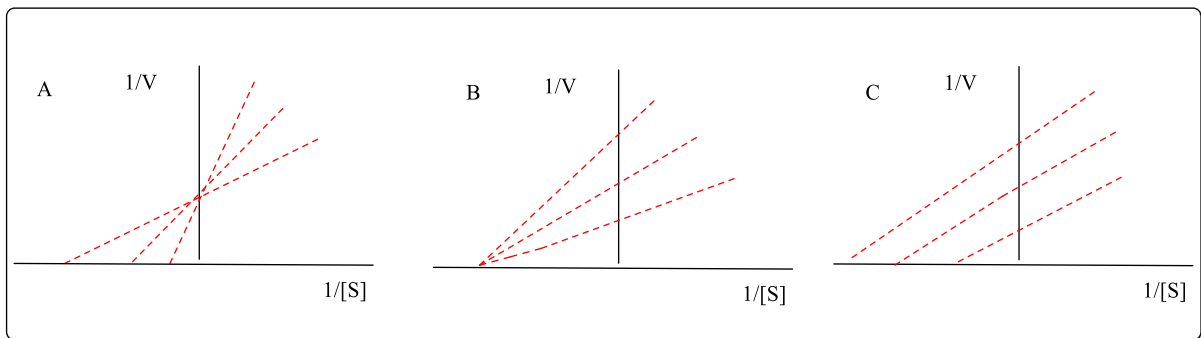
Şekil 11. Yarışmasız (Unkompetitif) inhibisyon

Geri dönüşümsüz inhibisyon

Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör maddeler enzime kovalent bağlanabilmesiyle beraber enzimin aktif bölgelerini bozabilir veya aktif bölgesiyle kovalent olmayan bağlar oluşturabilirler. Geri dönüşümsüz inhibitörler de özel grup vardır. Bu grup Ölümcül inaktifleştirici maddeler adı verilmiştir. Bu moleküller enzime bağlanıncaya kadar aktif değilken bağlandıktan sonra enzimle bir süre çalışarak ürün oluşturmak yerine enzimi inhibe eder. Ölümcül inaktifleştirici maddeleri akıllı ilaç üretiminin yanı sıra bu ilaçların yan etkilerinin giderilmesinde önemli rol oynar (Nelson *et al* 2013).

Bu çalışmada Proantosiyanidin ve Fikosiyanin DPPH, ABTS, DMPD ve bakır indirgeme radikal giderme metotlarına başvurularak antioksidan kapasitesine gibi antioksidan kapasiteleri incelenmiş ve insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II, α -glukozidaz, asetilkolinesteraz, α -amilaz enzimleri bazı metabolik enzim inhibisyon özellikleri araştırılmıştır. Proantosiyanidin ve fikosiyanin ile aktiviteleri incelenecektir.

Inhibisyon türleri ve K_i değerlerini belirlenebilmek amacıyla için yaygın kullanılan metot Lineweaver-Burk grafikleridir. $1/[V]$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği çizilerek, en az üç farklı inhibitör olarak kullanılan bileşik ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilir ve bu çizimler yardımıyla elde edilen kesim noktaları değerlendirilerek inhibisyon türleri belirlenir.



Şekil 12. Lineweaver-Burk grafikleri ile inhibisyon türünün belirlenmesi. A. Yarışmalı İnhibisyon, B. Yarışmasız İnhibisyon, C. Yarı Yarışmalı İnhibisyon

Çalışmanın Amacı

İnsanlar gerek beslenmeleri gerek mitokondriyal aktiviteleri sonucu serbest radikal oksijen türevleri ile başbaşa kalmaktadır. ROS'ların etkilerini inhibe etmek için serbest radikallerin kararlı hale geçmesi gerekmektedir. Bu noktada en büyük görev antioksidan maddelere düşmektedir.

Bu çalışmada ekzojen antioksidanlardan olan Proantosiyanidin ve Fikosiyanın inhibisyon özellikleri araştırılmıştır. Proantosiyanidin ve fikosiyanın enzim inhibisyonunda kullanılarak parkinson, alzheimer, diyabet türevleri arteriosklerozis, glokom gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği deneylerle gözlemlenmek istenmiştir. Proantosiyanidin ve fikosiyanın insan kanından elemine edilmiş karbonik anhidraz I ve II, Asetilkolinesteraz, α -glukozidaz, α -amilaz enzimleri ile aktiviteleri incelenecektir. Ayrıca DPPH, ABTS, DMPD ve bakır indirgeme radikal giderme metotlarına başvurularak antioksidan kapasitesine bakılmıştır. Yapılan çalışma sonuçları gerek kanser gerek başka hastalıkların tedavisinde ilaç yapımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Serbest radikaller, savunma ve restorasyon mekanizmalarını bozarak cilt hasarına önemli ölçüde katkıda bulunur ve yaşlanmayı hızlandırır. Bitkilerde bulunan doğal bileşikler, antioksidan özellikler ve serbest radikalleri temizleme yeteneği sergiler. Bitki kimyasına artan ilgi, doğal antioksidanlar olarak bitki materyallerine artan ilgiyle bağlantılıdır (Michalak *et al.* 2022). Oksidatif stres, kanser, ateroskleroz ve beyin disfonksiyonu gibi insan hastalıklarındaki rolü nedeniyle önemli bir araştırma konusu olmuştur. Metabolizma sırasında üretilen radikaller süperoksit anyon, hidroksil ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller, özellikle reaktif oksijen türleri, yağ asitleri, proteinler, DNA gibi makromoleküllere zarar verebilir ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olan diğer makromoleküller, kardiyovasküler hastalıklar, kanserler ve yaşlanmaya bağlı bozukluklar oluşturur (Öztaşkın ve ark. 2015). Dengeli ve besleyici bir diyet, sağlığın temel taşıdır. Beslenme piramidi, vitaminler ve mineraller gibi temel besin maddelerinin yanı sıra lif ve antioksidanlar sağladıkları için sağlıklı bir diyetin temel prensibi olarak günde 5 porsiyon meyve ve sebze yemeyi önerir. Bunları yeterli miktarda tüketmek bağışıklık sistemini geliştirir ve diyabet, obezite, kalp hastalığı ve hatta belirli kanser türleri gibi hastalıkların önlenmesine yardımcı olur (Arias *et al.* 2022).

Doğal antioksidanlar hidrofiliklikleri, geçirgenlikleri, biyolojik çevre ve fonksiyonel grupların özellikleri ile çok faktörlü etkileşimleri ile bu hastalıkların azaltılmasında önemli roller oynarken, antioksidatif etkiler bağ enerjilerine, hidrojen bağlarının vericilerine veya alıcılarına ve diğer fiziksel özelliklere bağlıdır (Liu 2022). Bir "antioksidan besin", bir antioksidan molekül için bir öncü veya kofaktör olabilir veya kendi başına bir antioksidan olabilir. E vitamininin birincil diyet formu olan α - tokoferol, hem antioksidan bir besin hem de fonksiyonel bir antioksidandır (Stone *et al.* 2022)

Diyabet, 21. yüzyılın en büyük sağlık krizlerinden biri olarak kabul ediliyor. Nişasta sindirim enzimi (α -amilaz ve α -glukosidaz) aktivitelerini inhibe ederek karbonhidrat sindirilebilirliğini kontrol etmek, tokluk hiperglisemiye kontrol etmek için etkili bir stratejidir. Son on yılda, sentetik inhibitörler, tip 2 diabetes mellitus (T2DM) yönetiminde en etkili farmasötik yaklaşımdır. Araştırmalarda Gıda kaynaklı nişasta olmayan polisakkaritler, peptitler ve lipid bileşiklerinin α -amilaz ve α -glukosidaz aktivitelerini inhibe ettiği belirlenmiştir (Li *et al.* 2022).

Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), pankreas β -hücreleri tarafından insülin direnci ve yetersiz insülin sekresyonundan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Hipergliseminin en önemli nedenlerinden biri karbonhidratların enzimatik hidrolizidir. α -Glikozidaz insan ince bağırsağında yer alır. α -glukozidaz aktivitesinin inhibisyonu, karbonhidrat sindiriminin gecikmesine ve dolayısıyla glikoz emiliminin azalmasına yol açar (Zhang *et al.* 2022). Akarbozun tip 2 diyabetli hastalarda yaşam beklentisini arttırdığı ve bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda kardiyovasküler olayların gelişme riskini azalttığı gösterilmiştir. Karotis plaklarını stabilize etmede etkinliği kanıtlanmıştır; hiperglisemiye azaltarak, oksidatif strese ve endotelial disfonksiyona karşı koyar (Akmal *and* Wadhwa 2022).

Biyomolekül sınıfındaki karbonhidratların büyük çoğunluğu güneş ışığı kullanılarak fotosentez yoluyla oluşturulur. Bu sınıftaki önemli enzimlerden biri α -glikosidazdır. Bu enzim, bileşik karbonhidratları monosakkarite kadar parçalar. Diğer önem arz eden enzim türü ise α -amilaz enzimidir. Hangi doğrudan nişasta ile ilgili. Nişasta, glikoz birimlerinin oksijenin C1 pozisyonunda glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polimer türüdür. α -Amilaz nişastadaki glikozidik bağları hidrolizleyerek katalize eden bir enzimdir. Bu enzim birçok mikroorganizma, hayvan ve bitkilerden saflaştırılır (Topal 2018). Demans hastalığı, dünya çapında yaşlı insanlarda, işleyişin ve kişinin yaşamının birçok yönünü etkileyebilen temel bir sağlık sorunudur. Aslında, çoğu demans hastalığının tedavisi yoktur, ancak çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI), kolinerjik bilişsel azalma varsayımının bir etkisi olarak geliştirilmiştir. Bu anlamda tedavilerin etkinliği, küresel, işlevsel, nöropsikiyatrik alanlar ve bilişsel alanlar arasında çok sayıda rastgele kontrollü testte araştırılmıştır. AChEI bileşikler, hafif ila orta dereceli Alzheimer hastalığının (AD) semptomatik tedavisi için gösterilmiştir. Hafıza fonksiyonuyla ilişkili bir nörotransmitter molekülü olan asetilkolinin (ACh) ayrılmasından sorumlu olan AChE'yi inhibe ederler (Turkan *ve ark.* 2019). RBC(kırmızı kan) hücrelerinde hCA I ve II izoenzimleri olarak adlandırılan iki genetik olarak farklı insan karbonik anhidraz (hCA) izoformu bulunur. CA II izoformu çok çeşitli doku ve hücrelerde ifade edilirken, CA I izoformu daha kısıtlı bir hücrel ifadeye sahiptir. Ayrıca hCA II izoformu, nitrit ve bikarbonat arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle NO molekülü üretebilir. hCA izoenzimleri, inhibisyonlarının anemi, oksidatif stres, glokom, ödem, kanser, epilepsi osteoporoz, obezite ve kısırlık gibi bir dizi bozukluğu tedavi etmek için kullanılabilecek terapötik hedeflerdendir (Öztaşkın *ve ark.* 2015)

CA izoformları, asit-baz dengesi, solunum, karbon dioksit ve iyon taşınması, kemik rezorpsiyonu, lipogenez ve elektrolit sekresyonu gibi birçok önemli biyolojik sürece katıldıkları

çeşitli dokularda bulunur. Bu süreçlerde yer alan bu tür birçok CA izozimi, ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporoz gibi çeşitli bozuklukların tedavisi için inhibe etme potansiyeline sahiptir(Turkan ve ark. 2019)

Fikosiyanin, mavi yeşil alglerde bulunan proteine bağlı bir pigmenttir. Düşük klorofil absorpsiyonunun olduğu bölgelerde ışığı emerek ve daha sonra enerji sonunda bir fotokimyasal reaksiyon merkezine ulaşana kadar yüksek enerji göçüne katılarak iş yapar. Reaksiyon merkezlerinde, elektronik enerji kimyasal enerjiye dönüştürülür. Biliproteinler genellikle fotosistem II ile doğrudan ilişkilidir, ancak biliproteinler tarafından emilen enerji de yayılma yoluyla fotosistem I'e ulaşır (Berns and MacColl 1989). Bir fikosiyanin fraksiyonu, bir gıda renklendiricisi ve biyolojik belirteçler sağlayabilir ve protein açısından zengin bir arta kalan su kültürü yemi olarak faydalı olabilir. Fikosiyanin, Spirulina'da bulunan ticari olarak kullanılan biyokimyasallar arasındadır. Fikosiyanin hali hazırda Spirulina'dan Japonya'da doğal gıda renklendiricisi olarak üretilmektedir. Spirulina fikosiyanin, fotosentez için temel bir fotoreseptör görevi görür ve diğer ile birlikte, tilakoid membranlarda bulunan fikobilizomlar adı verilen supramoleküler kompleksler halinde düzenlenir(Herrera *et al.* 1989).

Proantosiyainidinler, çeşitli farmakolojik özelliklere sahip yoğunlaştırılmış tanenlerdir . Bu fitokimyasallar, insan sağlığına yararları nedeniyle 'hücum ve savunma molekülleri' olarak kabul edilir. Antioksidan, antikanser, antidiyabetik , nöroprotektif ve antimikrobiyal gibi çeşitli sağlık açısından faydalı olması onlara değer kazandırmıştır. Proantosiyainidinler, flavonoidin son ürünü olarak üretilen monomerik flavan-3-ollerin oligo veya polimerleridir(Rauf et al. 2019). Aynı zamanda şarap, meyve suları ve çaylar gibi içeceklere tat ve burukluk verirler ve insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir.Tarımsal atıklar ve gıda işleme atıkları, sömürülmesi sürdürülebilir bir diyet takviyesi ve fonksiyonel içerik kaynağı olabilen muazzam miktarda proantosiyainidin içerir. Proantosiyainidinler, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bir savunma olarak çeşitli bitkilerin çiçeklerinde, kabuklu yemişlerinde, meyvelerinde, kabuklarında ve tohumlarında bulunur(Dixon et al. 2005). Proantosiyainidinler antioksidanlar olarak varsayılan bir role sahiptirler ve kalsiyuma bağımlı nitrik oksit salınımı yoluyla inflamatuvar süreci etkilerler ve H₂ O₂'ye karşı koruma sağlarlar. Ayrıca damar gevşemesi ve LDL oksidasyon inhibisyonu yoluyla kardiyovasküler hastalıklarda bir rol göstermenin yanısıra, serum glikozunda ve ileri glikasyon ürünlerinde azalma dahil olmak üzere, nöropati gibi diyabetik komplikasyonları iyileştiren aktiviteler de göstermiştir. Ayrıca proantosiyainidinler, tümör gelişimini azaltarak antikanser özelliklerde göstermiştir (De la Iglesia *et al.* 2010).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler

Tez sürecinde kullanılan antioksidanlarımız fikosiyanin ve proantosiyandin, L-Tirozin, Na_2SO_4 , NaHCO_3 , NaClO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , CH_3COONa , trihidroksimetilaminometan (Tris), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), (ABTS), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) radikali, sodyum sitrat, asetiltiyokolinyodat, 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit (DTNB), asetilkolinesteraz, 4-Nitrofenil β -D-glikopiranosid, etanol, metanol, izopropil alkol, aseton, hidroklorik asit, asetik asit, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit), bütillenmişhidroksianisol (BHA), trikloroasetik asit (TCA), bütillenmişhidroksitoluen (BHT), trolox ve α -tokoferol Sigma Aldrich'den sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan aletler ve cihazlar

pH-metre	: Thermo
UV-VIS spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Tek kanallı pipetler	: Eppendorf, Socorex ve Isolab
Saf su cihazı	: Test T350D
Hassas terazi	: SF 500
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Magnetik karıştırıcı	: JeioTech
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
UV-Spektrofotometreküveti	: 3 mL'lik ve 5 mL cam küvet, 1 mL'lik kuvars küvet

Kullanılan çözeltiler

Antioksidan yöntemler için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Fe³⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile alakalı çözelti hazırlanışı

1. Fosfat tamponu hazırlanışı (0,2 M): Na_2HPO_4 'tan 12,48 g tartıldı, 300 mL saf suda çözülerek pH'sı 6,6'ya ayarlanıp hacmi 400 mL olmak üzere distile su ile tamamlandı.
2. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi hazırlama (%10'luk): 3 g potasyum ferrisiyanür tartılıp 300 mL distile suda çözüldü.

3. TCA çözeltisinin hazırlanışı (%10'luk): TCA'dan 22,5 g tartıldı ve 225 mL distile suda çözüldü.
4. FeCl_3 çözeltisinin hazırlanışı (%0,1'lik): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'dan 170 mg tartıldıktan sonra 100 mL distile suda çözüldü.

Kuprak indirgeme kapasitesi tayiniyle alakalı çözelti hazırlanışı

1. CuCl_2 çözeltisinin hazırlanması (0,01 M): 94 mg CuCl_2 tartıldı ve 100 mL distile suda çözüldü.
2. Neokuprin çözeltisinin hazırlanması: Neokuprin'den 78 mg tartıldı ve 50 mL %98'lik etanolde çözülerek hazırlandı.
3. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (1 M'lık): $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 'dan 15,4 g tartıldı ve 160 mL distile suda çözüldü. pH'sı 6,5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

DPPH serbest radikal giderme aktivitesiyle alakalı çözeltilerin hazırlanması

1. DPPH $\cdot$ çözeltisinin hazırlanması: Alüminyum folyo ile kaplanmış bir beher içerisinde 30 mg DPPH tartılıp 150 mL %96'lık etanolde 12-15 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

ABTS⁺ giderme tayiniyle alakalı çözeltilerin hazırlanması

1. ABTS çözeltisinin hazırlanması (2 mM'lık): 0,30 g ABTS tartılıp bir miktar distile su ile çözüldü ve son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. Potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanışı (2,5 mM'lık): 132,5 mg ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) fosfat tamponunda (0,1 M, pH 7,4) tamamen çözününceye kadar 8-12 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve toplam hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

DMPD⁺ giderme tayiniyle alakalı çözeltilerin hazırlanması

1. Asetat tamponu hazırlama (0,1 M'lık): 460 mL distile suda 4,1 g CH_3COONa tartılıp saf su ile çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 5,25'e ayarlandı. Hacim olarak saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
2. DMPD^+ çözeltisinin hazırlanışı (0,1 M'lık): 315 miligram DMPD tartılıp 15 mililitre saf su ile çözüldü.
3. DMPD^+ çözelti hazırlanışı (10 mM): 10/1 M'lık DMPD çözeltisinden 2 mL alınıp 0,1 M'lık asetat tamponuna eklendi ve üzerine 0,4 mL ve 0,05 M'lık FeCl_3 ilave edildi.

4. FeCl_3 çözeltisinin hazırlanışı (0,05 M'lık): 2,43 g FeCl_3 tartılıp 300 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

Karbonik anhidraz ilgili çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Afinite jelin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl /0,1 M Na_2SO_4): 3,028 g Tris ile 14,2 g Na_2SO_4 alındı 950 ml destile suda çözöldü, pH 8,7'e ayarlandıktan sonra sonra distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.
2. Hemolizatın eklenmesinin ardından afinite jeli yıkanmasında görev alan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl /22 Mm Na_2SO_4): 3,026 g Tris ile 3,124 g (22 mmol) Na_2SO_4 tartıldı ve yaklaşık olarak 950 mL destile suda çözöldü. pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. hCA I izoenzimlerinin elüsyonunda kullanılan tampon çözeltisi (25 mM Na_2HPO_4 /1 M NaCl): 2,2 g Na_2HPO_4 ile 14,63 g NaCl tartıldıktan sonra 200 mL destile suda çözölerək pH 6,3'e ayarlanıktan sonra son hacim olan 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.
4. Esteraz aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon çözelti (0,05 M Tris- SO_4): 6,05 g Tris tartılıp 950 mL saf su içinde çözöüröldü, H_2SO_4 (1,0 N) ile pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplam hacmi saf suyla 1 L'ye tamamlandı.
5. hCA II izoenziminin elüsyonunda kullanılan tampon çözelti (0,1 M CH_3COONa /0,5 M NaClO_4 , pH 5,6): 9,187 g NaClO_4 ile 2,04 g CH_3COONa tartılıp 120 mL destile su içerisinde çözöldü. 1,0 N HCl ile pH'sı 5,6 ya ayarlandı ve hacmi destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Tris-HCl Tamponu (1,0 M'lık, pH 8): 60,54 g Tris ile 0,740 g EDTA tartılıp 400 mL saf suda çözöldü, pH'sı 8.0'a getirilerek sonra hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. Asetiltiyokolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması (10 mM'lık): Alüminyum folyo ile kaplanmış behere 0,145 g Asetiltiyokolin iyodat alındı ve 50 mL distile suda çözöldü.
3. DTNB Çözeltisinin Hazırlanması (10 mM'lık): Alüminyum folyo ile kaplanmış behere 10 mg DTNB ile 0,5 g sodyum sitrat tartıldı ve 50 mL destile suda çözölerək hazırlandı.

α -Glikozidaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivite ölçmesi için, 0,1 M): 6,0 g sodyum fosfat tartıldı ve 450 mL distile suda çözündü, pH'sı 6,9'a ayarlanıp hacmi 500 mL'ye distile su ile tamamlandı.
2. 4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid substrat çözeltisinin hazırlanması (5 mM'lık): 37,6 mg 4-Nitrofenil β -D-glukopiranosid substrat tartıldı, 0,1 M'lık 25 mL fosfat tamponundan çözülerek hazırlandı.

α -Amilaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. α -Amilaz enzim çözeltisi: 5 mg α -amilaz enzim alınarak ve 5 mL destile suda çözöldü.
2. 1/10 M Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivitesini hesaplamak için): 5,99 g sodyum fosfat tartıldı. Sonradan 450 mililitre distile suyun içerisinde çözöldü, pH'yı 6,9'a ayarlanıp hacmi 500 mL'ye distile su ile tamamlandı.
3. Nişasta Substratı Hazırlama: 25 mL saf su içerisinde 25 mg nişasta tartılıp çözöndü.

Yöntemler

Antioksidan yöntemler

DPPH serbest radikali giderme aktivitesi

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) en çok kullanılan yöntemlerdendir. Antioksidan aktiviteyi ölçmek akla gelen ilk yöntemlerden biridir. Koyu mavi renge sahiptir. Dimerizasyona uğramaması nedeniyle uzun ömürlü bir nitrojen radikal türüdür (Gölçin ve ark. 2002a, b). Fazla elektronu molekül üzerinde delokalizasyonu nedeniyle kararlı bir serbest radikal olarak karakterize edilir, böylece molekül, diğere birçok serbest radikalde olduğı gibi dimerleşmez. 517 nm dalga boyunda absorbans verir. Blois metoduna göre DPPH serbest radikal giderme yapıldı. Radikal ise DPPH'ın 1 mM'lık solüsyonu kullanılmıştır. Önceden hazırlamış olduğumuz 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti kullanıldı.

Tablo 1. DPPH Radikal Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Numune miktarı (µL)	DPPH [•] çözeltisi (µL)
19	250
38	250
56	250
112	250
169	250

ABTS radikal giderme aktivitesi

ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikal katyonunun üretilmesi, sulu karışımların saf maddelerin ve içeceklerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturur (Gülçin 2009). ABTS^{•+} lipofilik birlikte hidrofilik bileşikler için geçerlidir. ABTS^{•+} radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftir. Bu yöntemde ABTS, oksidanlar tarafından yoğun renkli olan ABTS^{•+} radikal katyonuna oksitlenir ve antioksidan kapasite, test bileşiklerinin ABTS radikali ile doğrudan reaksiyona giren rengi azaltma yeteneği olarak ölçülür. 734 nm dalga boyunda absorbanans verir.

Re ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre ABTS radikali giderme aktivitesi belirlendi (1999). Hazırlanan ABTS çözeltisi ile 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi radikal oluşması için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. ABTS çözeltisi kullanılmadan önce kör olarak tampon çözeltisi kullanılarak 734 nm'de absorbanans bakıldı. Kör olarak etanol kullanıldı. Absorbanans değeri 750 ± 25 olarak ayarlandı.

Tablo 2. ABTS Radikal Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Numune Miktarı (µL)	ABTS ^{•+} (µL)	Potasyum Persülfat (µL)
15	100	885
30	100	870
45	100	855

DMPD radikal giderme aktivitesi

DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamin) kullanılarak gıda numunelerinin antioksidan aktivitesini ölçmek için kullanılır. DMPD radikal katyonu, potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) ve demir klorür ($FeCl_3$) ile oksidasyon yoluyla oluşturulan kararsız bir moleküldür. Ferrik iyonların (Fe^{3+}) varlığında, N,N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD), renkli DMPD radikal katyonuna ($DMPD^{•+}$) dönüştürülür. Fogliano ve arkadaşlarının metoduna göre N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikal giderme aktivitesi belirlendi (1999).

Öncelikle radikal katyon (DMPD^{•+}) oluşturuldu. Tablo 1’da gösterildiği şekilde istenilen miktarlarda çözeltiler aktarıldı. Bir saat inkübasyondan sonra 505 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kör olarak numune yerine tampon çözelti kullanıldı

Tablo 3. DMPD^{•+} Giderme Aktivitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Numune miktarı (μL)	DMPD ^{•+} (μL)	Distile Su (μL)
15	500	250
30	500	250
45	500	250

Cu²⁺ İndirgeme Kapasitesi (Kuprak metodu)

Bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlar içeren çeşitli matrislere de kullanılmıştır. Cu²⁺-Neeokuprin'nin Cu⁺-Neeokuprin'nin'a indirgenmesi esasına dayanır. İndirgenen Cu⁺-Neeokuprin kompleksi 450 nm'de maksimum absorbans verir (Gülçin 2008). Cu²⁺ indirgeme Apak metodunun (Apak *et al.* 2006) kısmi değişimiyle yapılmıştır (Gülçin 2008). 2 mg/mL stok çözelti hazırlandı. Numuneler asetat tamponu çözeltisi ile 250 μL'ye tamamlandı. Tabloda gösterilen miktarlarda çözeltiler aktarıldı. 450 nm de absorbansına bakıldı. Kör olarak numune yerine distile su kullanıldı.

Tablo 4. Cu²⁺ İndirgeme Kapasitesi (Kuprak Metodu) Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Numune (μL)	CuCl ₂ (μL)	Neokuprin (μL)	Asetat tamponu (μL)
15	250	250	250
30	250	250	250
45	250	250	250

Fe³⁺ indirgeme kapasitesi

Bu metotta demir(III)'ün demir(II)'ye direk indirgenme kapasitesi esasına dayanmaktadır. Oyaizu yöntemine göre indirgeme kuvveti tayini yapıldı (1986). İlk olarak 1 mg/mL derişiminde stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyondan değişik derişimlerde deney tüplerinin içerisine konuldu. Bu amaçla deney tüplerlerine sırasıyla tampon çözelti, K₃Fe(CN)₆ çözeltisi ve farklı konsantrasyonlarda numuneler eklendikten sonra 20 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübe süresi sona erdikten sonra alınan numune tüplerine 1.25 ml (10/1'lik) TCA çözeltisi aktarıldı. Çözeltinin üstündeki reaktanttan 1.25 mL alınarak hazırlanan yeni tüplere aktarıldı. Tüplere 1.25 mililitre distile su ve 0.25 mililitre %0.1'lik FeCl₃ çözeltisi aktarıldı. Absorbans değerleri 700 nm’de köre karşı kaydedildi. Kıyaslama yapmak için kontrol olarak numune yerine distile suyla ölçüm yapıldı.

Tablo 5. Fe³⁺ İndirgeme Kapasitesinde Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Numune miktarı (µL)	Fosfat tamponu (µL)	K ₃ Fe(CN) ₆ çözeltisi (µL)
97.5	1250	1250
195	1250	1250
293	1250	1250
585	1250	1250
878	1250	1250

Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırması ile ilgili çalışmalar

Alınan taze insan kanından elde edile eritrositleri 5mL kan alınarak yaklaşık 24 mL altında buz bulunan soğuk ile karıştırılarak ilk olarak hemoliz edildi. Hemolizatın içinde bulunan eritrositlerin içerisindeki hücre zarlarını uzaklaştırmak için hemolizat +4°C’de 10.000xg’de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısımdaki reaktant özenli şekilde damlalıkla alınıp, sonraki çalışmalarda kullan için +4°C’de tutuldu (Hunaiti & Abukhalaf, 1987). hCA I ve II enzimleri, Sefarose-4B-L-Tirozine-sulfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır (Bilginer ve ark., 2022). hCA aktivitesi, daha önceden verilen ayrıntılı yöntemle göre spektrofotometrik olarak kaydedildi (Ağgöl ve ark. 2022). Bir CA birimi, 348 nm’de (25°C) 3 dakika boyunca p-nitrofenilasetatın (PNA) p-nitrofenolata (PNP) katalizlediği CA miktarı olarak kaydedilir (Durmaz ve ark. 2022a). Tüplerdeki kalitatif hCA izoenzim miktarı 280 nm’de belirlendi (Kaya ve ark. 2022). Ayrıca protein miktarı 595 nm’de spektrofotometrik olarak kaydedildi (Günsel ve ark. 2022). Sığır serum albümini, standart protein belirteci olarak kullanıldı (Burmaoğlu ve ark. 2022). Enzim saflığının kontrolü için SDS-PAGE yapıldı. Bu amaçla %0.1 SDS içeren %3 ve %10’luk iki akrilamid konsantrasyonu kullanılmıştır (Atasever ve ark. 2013) ..

CA izoenzimleri üzerine proantosiyanidin ile fikosiyanın etkilerinin belirlenmesi

Proantosiyanidin ve fikosiyanın, taze insan eritrositlerinden saflaştırılmış olan hCA izoenzimlerinin üzerindeki etkisi esteraz aktiviteleri ile belirlendi. Bu amaçla öncelikle Proantosiyanidin ile Fikosiyanın %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bunun için beş farklı Proantosiyanidin ile Fikosiyanın konsantrasyonu kullandı. Daha sonra K_i değerlerini bulmak için Proantosiyanidin ile Fikosiyanın’ın IC₅₀ değerlerine yakın üç farklı konsantrasyonu kullanılarak aktivite değerleri saptandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafiklerden elde edilen denklemler ile üç farklı K_i değeri hesaplandı. Bu üç farklı K_i değerinin de aritmetik ortalaması alınarak ortalama K_i

değerleri hesaplandı. Ayrıca Lineweaver-Burk grafiklerinin şekllinden de Proantosiyanidin ile Fikosiyanin inhibisyon tipleri belirlendi.

AChE üzerine proantosiyanidin ile fikosiyanin etkisinin belirlenmesi

Proantosiyanidin ve fikosiyanin, AChE enzimi üzerindeki etkisi Ellman metodu kullanılarak araştırıldı (1961). İnhibisyon türleri belirlenebilmesi için elde edilen verilerle IC₅₀ değerleri hesaplandı. AChE, asetilkolinin hidrolizini katalizleyerek ve asetilkolinin tiyokolin ve asetatın dönüşmesinde görev alan enzim olarak bilinmektedir. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan DTNB ise bu parçalanma sonucu oluşan ürünlerinden tiyokolinle reaksiyonu sonucunda rengi sarı olan bileşik 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşmaktadır. Oluşan madde ise 412 nm’de renk şiddeti ölçüldü. Kör ve numune küvetlerinin 412 nm’de, başlangıç ve 300. Saniyedeki absorbans değerleri saptanıp kaydedildi (Ellman, *et al.* 1961).

Tablo 6. AChE Enzimi Aktivite Tayini İçin Kullanılan Reaktifler

Kullanılan maddeler	Numune küveti (µL)	Kontrol küveti (µL)
Tamponu (Tris / HCl)	200	200
Saf su	1540	1600
DTNB	100	100
Enzim	60	-
AChI	100	100
Toplam hacim	2000	2000

α -Glikozidaz ve α -Amilaz üzerine proantosiyanidin ile fikosiyanin etkilerinin belirlenmesi

Ticari enzimlerden olan α -Glikozidaz ve α -Amilaz enzimlerinin proantosiyanidin ve fikosiyanin tarafından inhibisyon etkisi Tao ve arkadaşlarının (2013) belirlediği metoda göre gerçekleştirildi. İnhibisyon türleri belirlenebilmesi için IC₅₀ değerleri bulundu α -Glikozidaz enzimi aktivitesi tayininde substratı olarak *p*-NPG kullanılan kullanıldı ve 405 nm’de absorbanslar spektrofotometrik olarak ölçüldü. Diğer taraftan α -Amilaz enziminin aktivitesi ise Xiao ve arkadaşlarının (2006) belirlediği prosedüre göre yapıldı. Proantosiyanidin ile Fikosiyanin α -Amilaz enzimi üzerindeki etkisi enzim aktivitesinin 580 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek gerçekleştirildi.

Tablo 7. α -Glikozidazın Aktivitesinde Kullanılan Reaktif Miktarı

Kullanılan maddeler	Numune küveti (μL)	Kontrol küveti (μL)
Fosfat tamponu	200	200
Saf su	1680	1580
Enzim çözeltisi	20	20
İnhibitör	-	100
<i>p</i> -NPG	100	100
Toplam hacim	2000	2000

Tablo 8. α -Amilazın Aktivitesinde Kullanılan Reaktif Miktarı

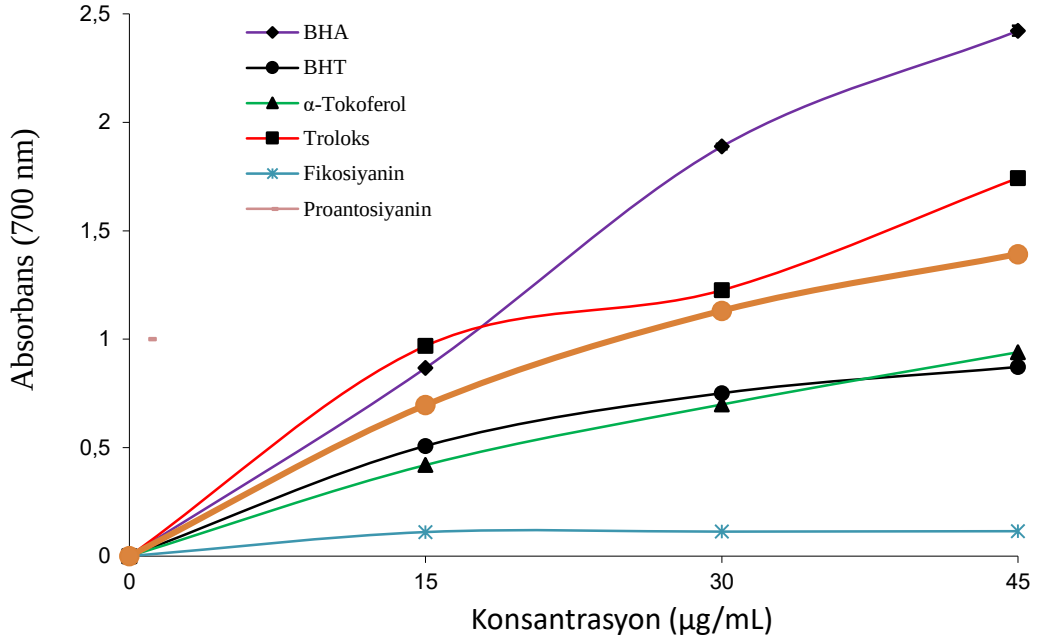
Kullanılan Maddeler	Numune küveti (μL)	Kontrol küveti (μL)
İnhibitör	-	100
Nişasta	1000	1000
Tampon	500	400
Enzim	500	500
Toplam hacim	2000	2000

ARAŞTIRMA BULGULARI

Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Bulgular

Fe^{3+} indirgeme kuvveti analiz sonuçları

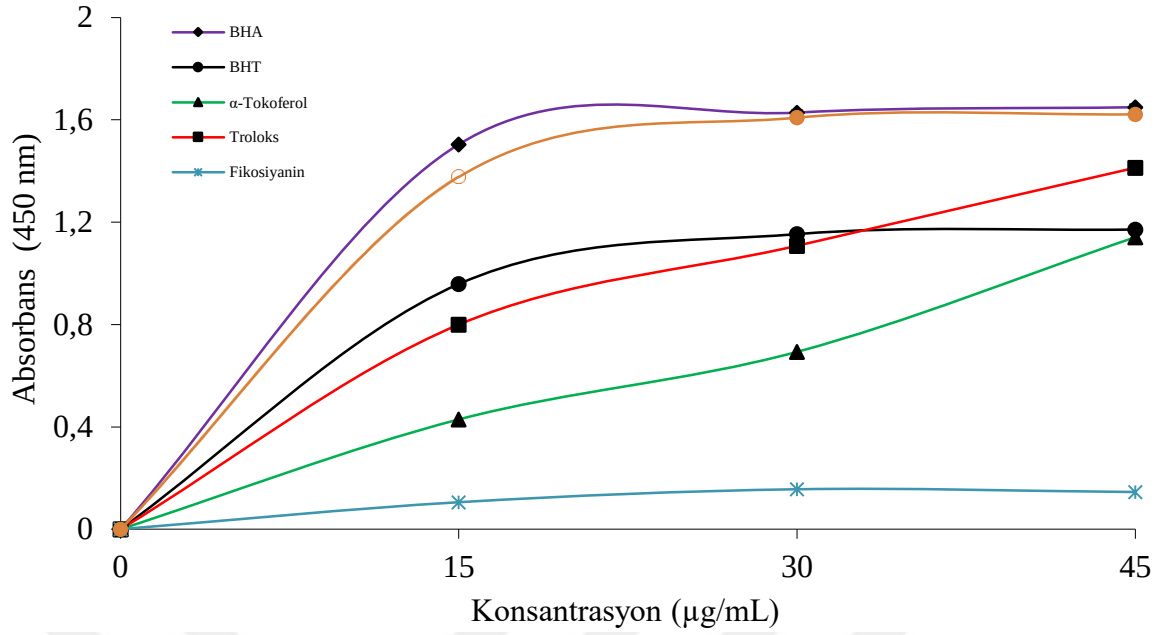
Proantosiyanidin ve Fikosiyanin maddelerinin Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasitesine farklı miktarlarda numuneler kullanarak 700 nm’de absorbans değeri bulundu. Karşılaştırma için α -Tokoferol, Troloks, BHA ve BHT standard antioksidanları Proantosiyanidin ve Fikosiyanin miktarlarına paralel olarak kullanıldı ve absorbans değerleri elde edilerek karşılaştırıldı.



Şekil 13 Pozitif kontrol olarak standart antioksidanlardan kullanıldığımız BHA, α -tokoferol, BHT ve troloks’un proantosiyanidin’in ve fikosiyanin’in farklı miktarlardaki (15-45 µg/mL) Fe^{+3} (ferrik iyonları) indirgeme kuvveti ile kıyaslanması

Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti sonuçları

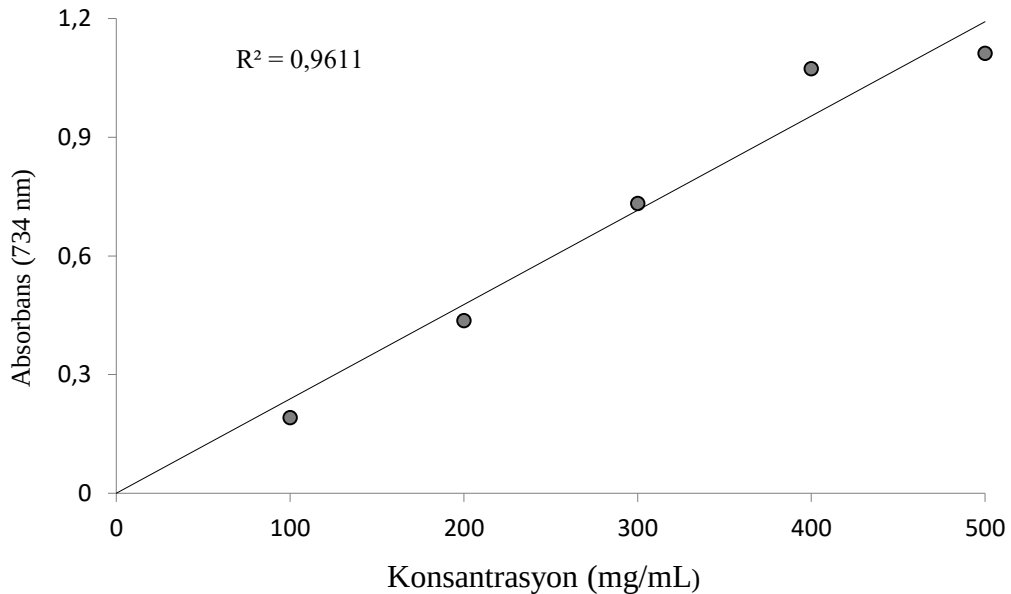
Proantosiyanidin ve Fikosiyan’in Cu^{2+} indirgeme kapasitesi 450 nm’de farklı konsantrasyonlarda absorbansı değerleri belirlendi. Karşılaştırma için ise standart kullanılan antioksidanlardan α -Tokoferol, BHA, Troloks ve BHT kullanıldı.



Şekil 14. Pozitif kontrol olarak standart antioksidanlardan kullanıldığımız BHA, α-tokoferol, BHT ve troloks'un proantosiyandin'in ve fikosiyanin'in farklı miktarlardaki (15-45 µg/mL) Cu^{2+} (kuprik iyonlarını) indirgeme aktivitesinin karşılaştırılması

ABTS radikal giderme aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde öncelikle ABTS molekülünden ABTS^+ radikali oluşturulmalıdır. Bu radikali oluşturmak için bir erlen içerisine 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu ve 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Sonradan oda sıcaklığında bu çözelti içersine 2,45 mM'lık potasyum persülfat eklenip manyetik karıştırıcıyla 1 gece süresince karıştırıldı. 734 nm dalga boyunda absorbans değeri ise 0.750 ± 0.030 değerlerinde tampon çözelti ile ayarlanıp deneysel çalışmalarımızda kullanıldı.



Şekil 15. ABTS^{++} Metodu için hazırlanmış olan standart grafik

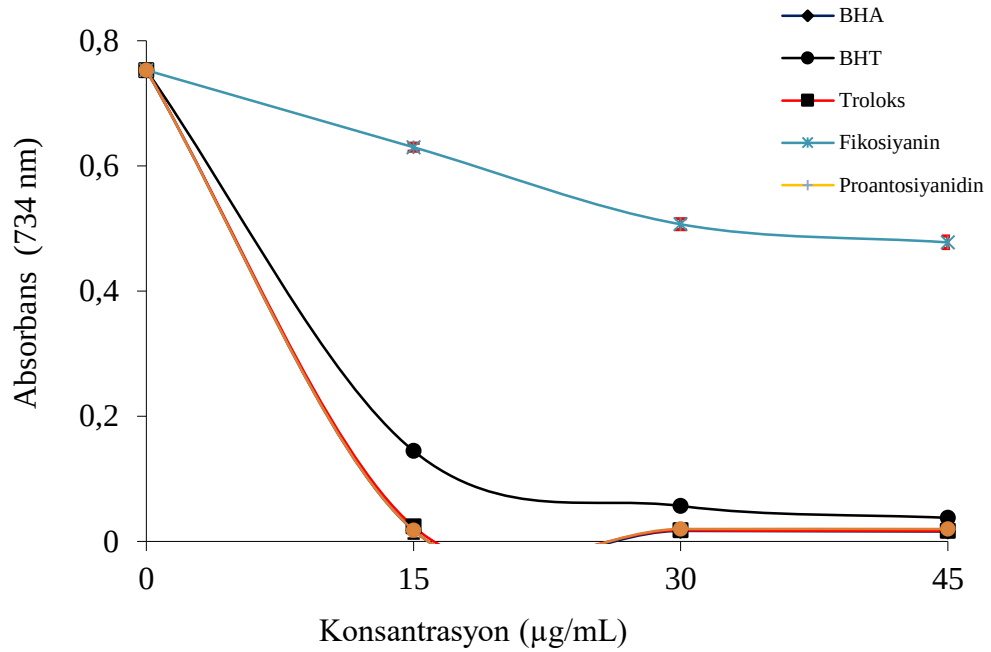
ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesinde kalan ABTS^{•+} miktarı standart grafikten bulunup aşağıdaki denklem ile hesap yapılmıştır.

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

ABTS^{•+} giderme aktivitesinde ki hesaplama işlemleri aşağıdaki denklem ile yapılmıştır.

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

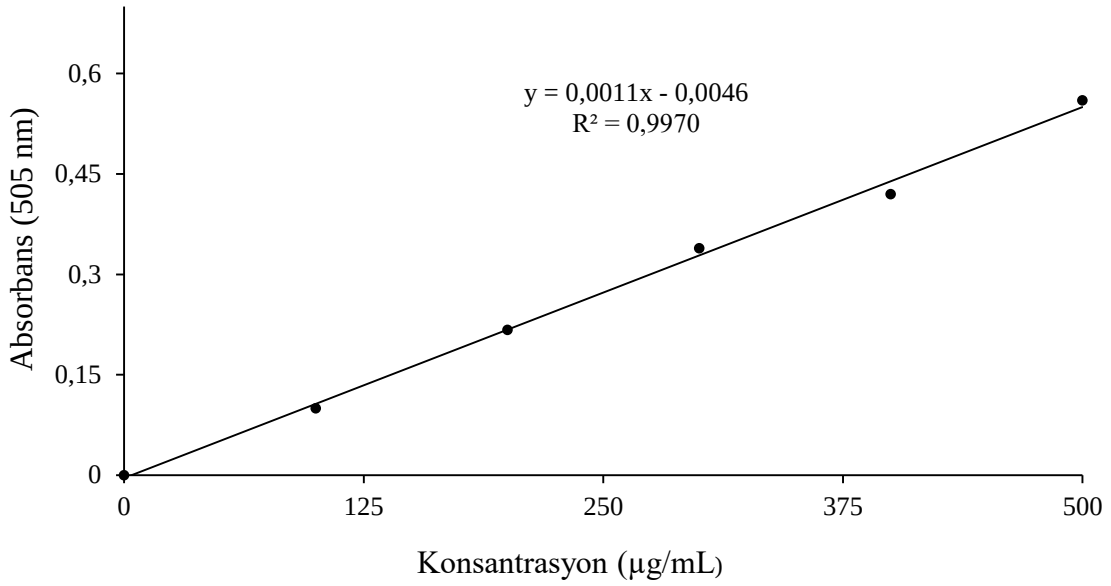
λ_{734-N} ABTS^{•+} radikal çözeltisi içine numuneleri ekleyip absorbans değerleri, λ_{734-K} ise yalnızca ABTS^{•+} radikal çözeltisini ihtiva eden kontrol numunesinin absorbans değerini açıklar. Standart antioksidanlardan α -Tokoferol, Troloks BHA ve BHT, kullanıldı.



Şekil 16. Fikosiyanin'in ve proantosiyainidin'in farklı miktarlardaki (15-45 µg/mL) ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesinde standart olarak kullanılan BHA, troloks ve BHT antioksidanları ile kıyaslanması

DMPD radikal giderme aktivitesi sonuçları

Farklı konsantrasyonlardaki Proantosiyainidin ve Fikosiyanin ve standart antioksidanların 505 nm'de absorbans değerlerine kaydedildi. Standart grafikten çıkarılan denklem vasıtasıyla DMPD^{•+} miktarı hesaplandı.



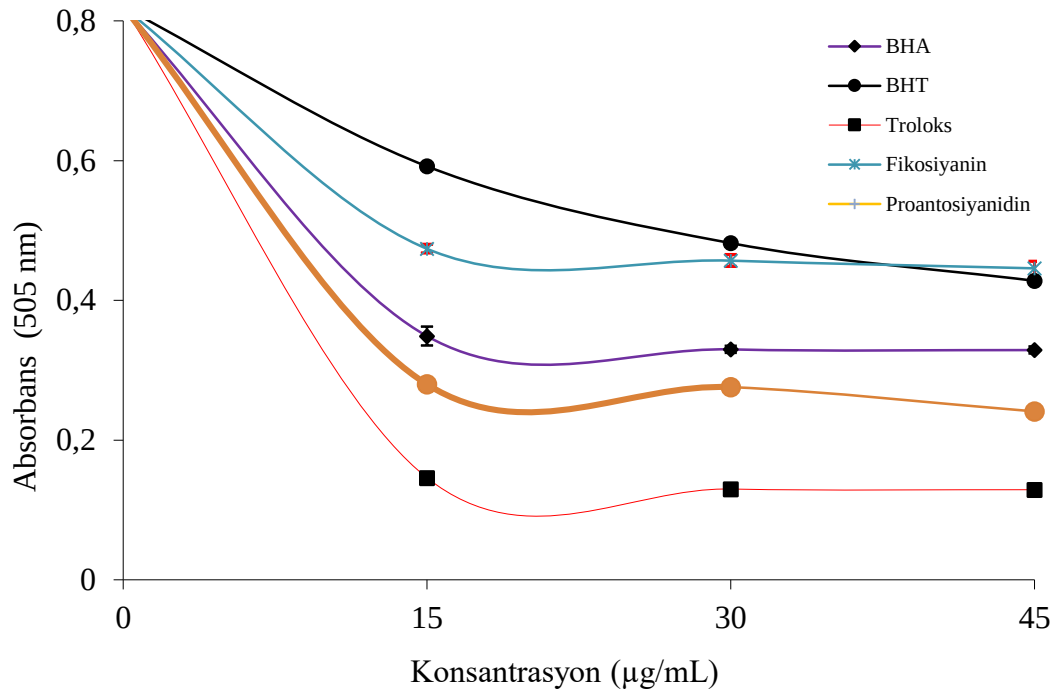
Şekil 17. DMPD^{•+} giderme aktivitesine özel hazırlanmış olan standart grafik ($r^2:0,9970$)

$$(\text{Absorbans}_{\lambda_{505}}) = 0,0011 \times [\text{DMPD}^{\bullet+}] - 0,0046$$

DMPD^{•+} tayinindeki azalma miktarı yüzdelik değerde aşağıdaki denklemden bulunur.

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

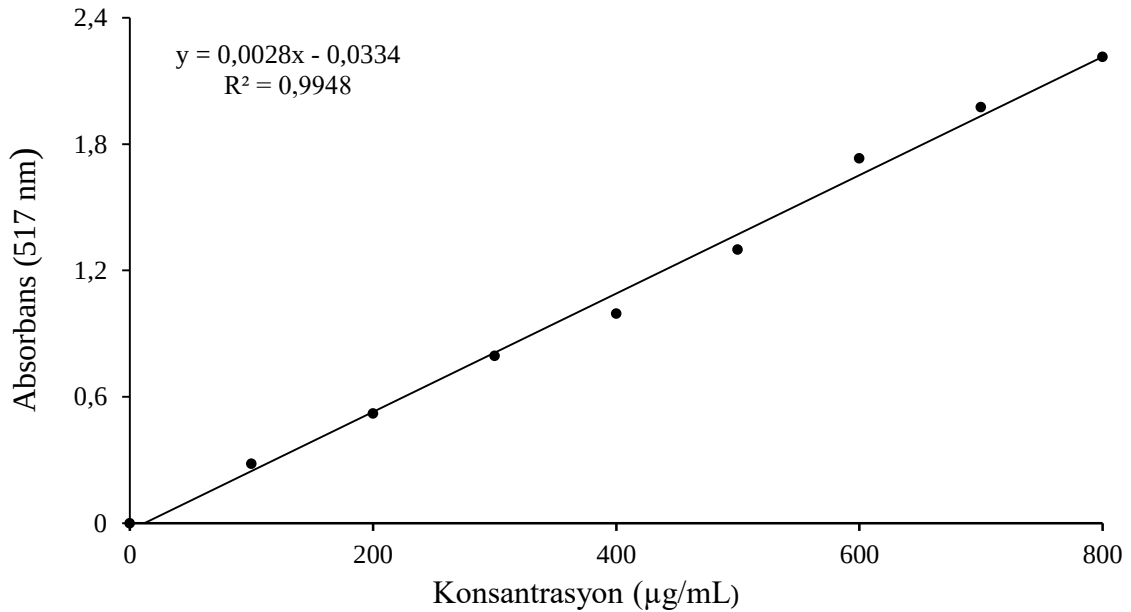
Bu noktada λ_{505-N} , DMPD^{•+} çözelti içerisine numune ekledikten sonra elde edilen absorban değerimiz, λ_{505-K} ise yalnızca DMPD^{•+} çözeltisini ihtiva eden kontrol değerinin absorbanısını açıklar. Standart antioksidanlardan ise α -tokoferol, BHA, BHA ve troloks kullanıldı.



Şekil 18. Fikosiyanin'in ve proantosiyanidin'in farklı miktarlarda ki (15-45 µg/mL) DPPH⁺ giderme aktivitesinde standart antioksidan görevinde kullanılan troloks, BHA ve BHT ile karşılaştırması

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi sonuçları

Fikosiyanin ve proantosiyanidin kıyaslama olarak standart antioksidanlardan BHA, α -Tokoferol BHT ve Troloks'un DPPH serbest radikal giderme yönteminde 517 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Çalışma için kullanılacak standart grafik aşağıda ki denklemden oluşturuldu.



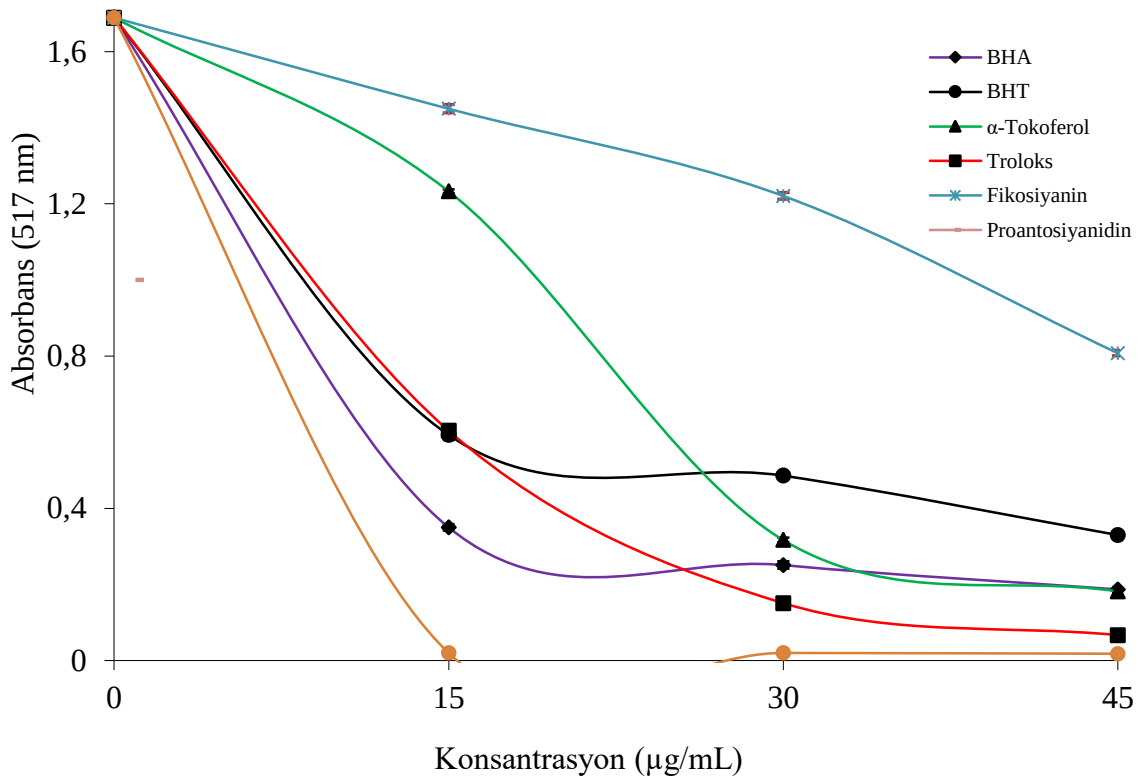
Şekil 19. DPPH⁺ giderme aktivitesi için hazırlanan standart grafik (r^2 :0,9948)

$$(\text{Absorbans } \lambda_{517}) = 0,0028 \times [\text{DPPH}] - 0,0334$$

DPPH metoduyla alakalı hesaplama işlemleri aşağıdaki denklem ile yapılmıştır.

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

Bu noktada λ_{517-N} DPPH radikal çözeltisine eklenen numuneler ile elde edilen absorbans değeri, λ_{517-K} ise yalnızca DPPH radikal çözeltisi ihtiva eden kontrol değerinin absorbans değerini açıklar. Kontrol troloks, BHA, BHT ve α -Tokoferol kullanıldı.

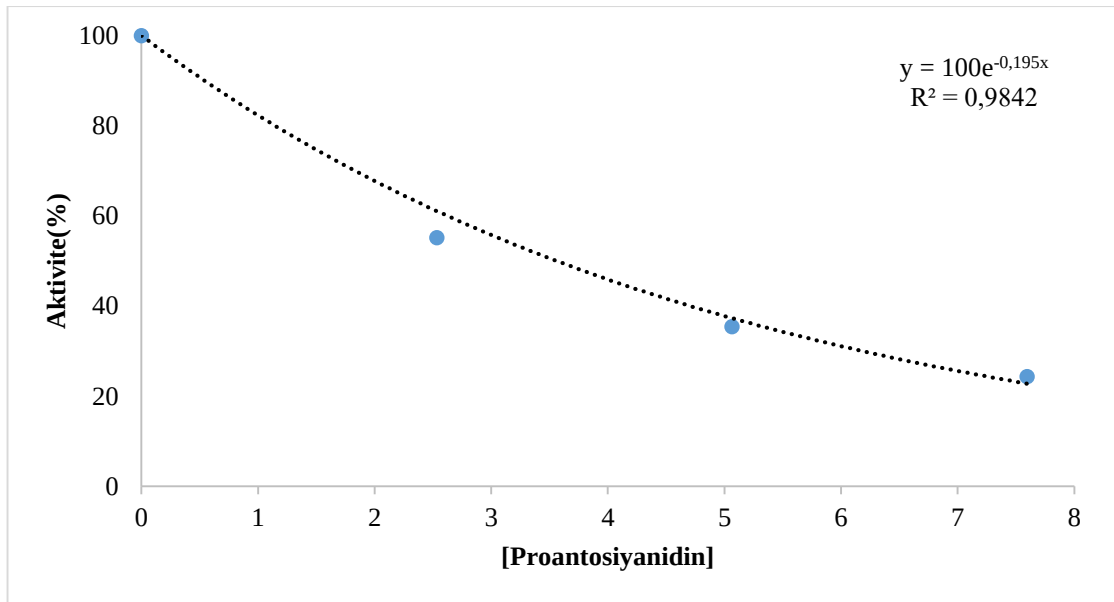


Şekil 20. Fikosiyenin'in ve proantosiyanidin'in farklı miktarlarda ki (15-45 µg/mL) DPPH radikal giderme aktivitesinde pozitif kontrol olarak standart antioksidan kullanılan BHA, BHT ve Troloks ile karşılaştırılması

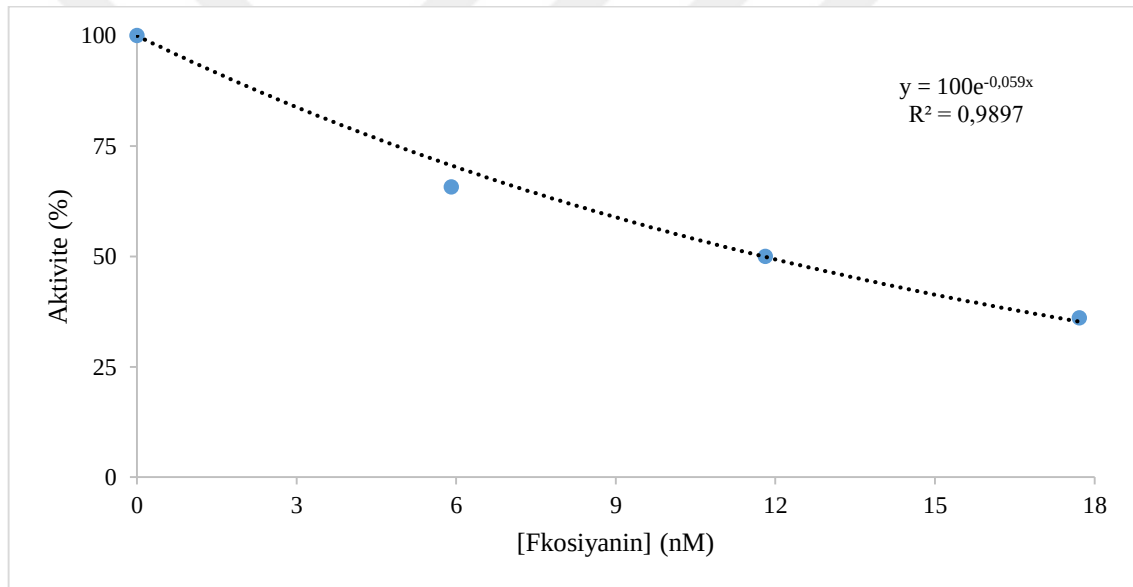
Enzim İnhibisyonları ile İlgili Bulgular

α -Amilaz enzim inhibisyonu sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda yapılan bu çalışmada α -amilaz enzimi üzerine proantosiyanidin ve fikosiyenin inhibisyon etkileri incelendi. Bu maddelerin α -amilaz üzerine İnhibisyon etki gösteren proantosiyanidin ve fikosiyenin için IC_{50} değeri bulunarak aktivite grafikleri çizildi. α -amilaz enzimi için kullanılan substrat nişasta olduğu için ve nişasta da polimerik bir madde olduğundan ve mole ağırlığı belli olmadığından inhibisyon gösteren maddelerin K_i değerleri hesaplanamamıştır.



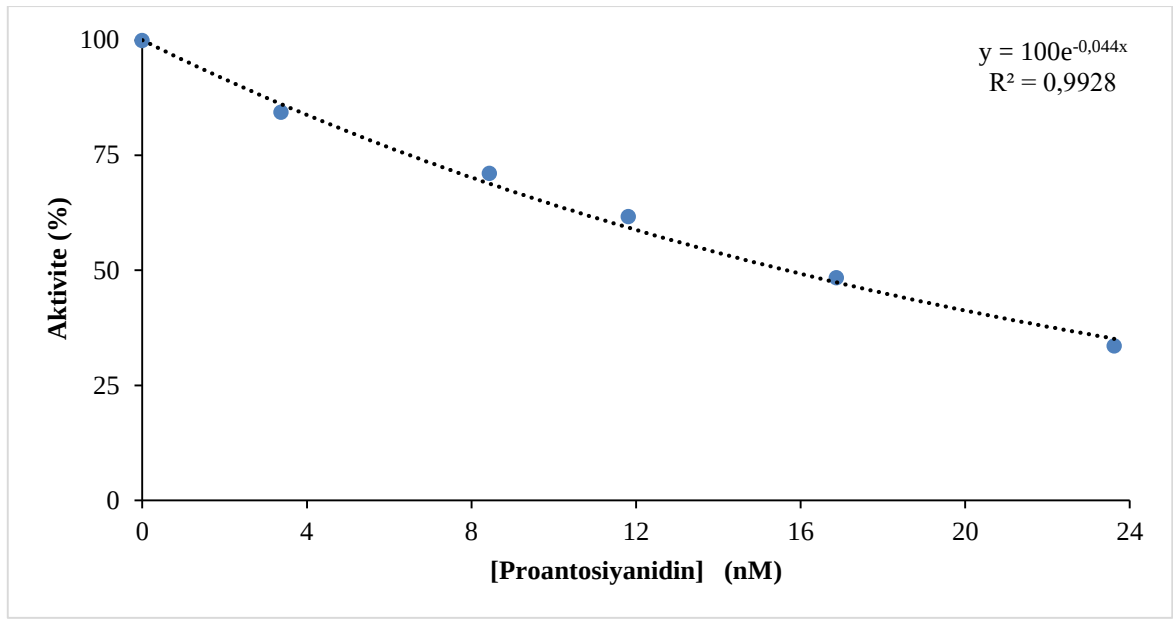
Şekil 21. Proantosiyanidin maddesinin α -amilaz enzimi ile aktivite (%) grafiği



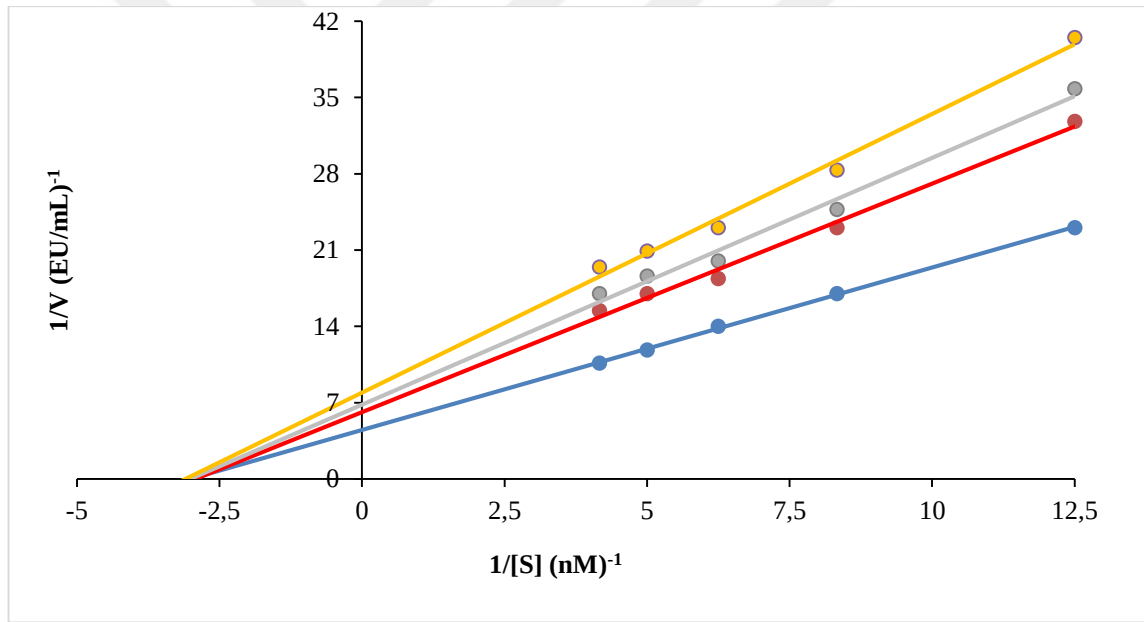
Şekil 22. Fikosiyanin maddesinin α -amilaz enzimi ile aktivite (%) grafiği (r^2 :0,9897)

Asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

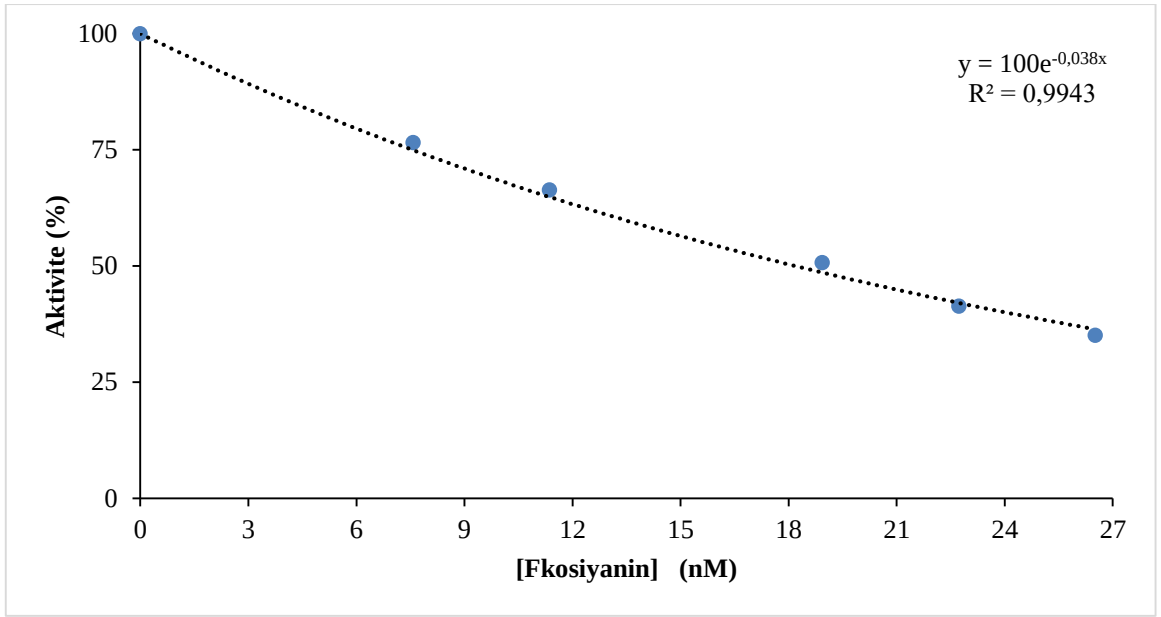
Doygun substrat konsantrasyonu ile çalışılan asetilkolinesteraz enzimi üzerine proantosiyanidin ve fikosiyanin inhibisyon etkileri incelendi. Bu maddelerin için IC_{50} değerleri bulunarak, Lineweaver-Burk grafiklerinden K_i değerleri hesaplandı.



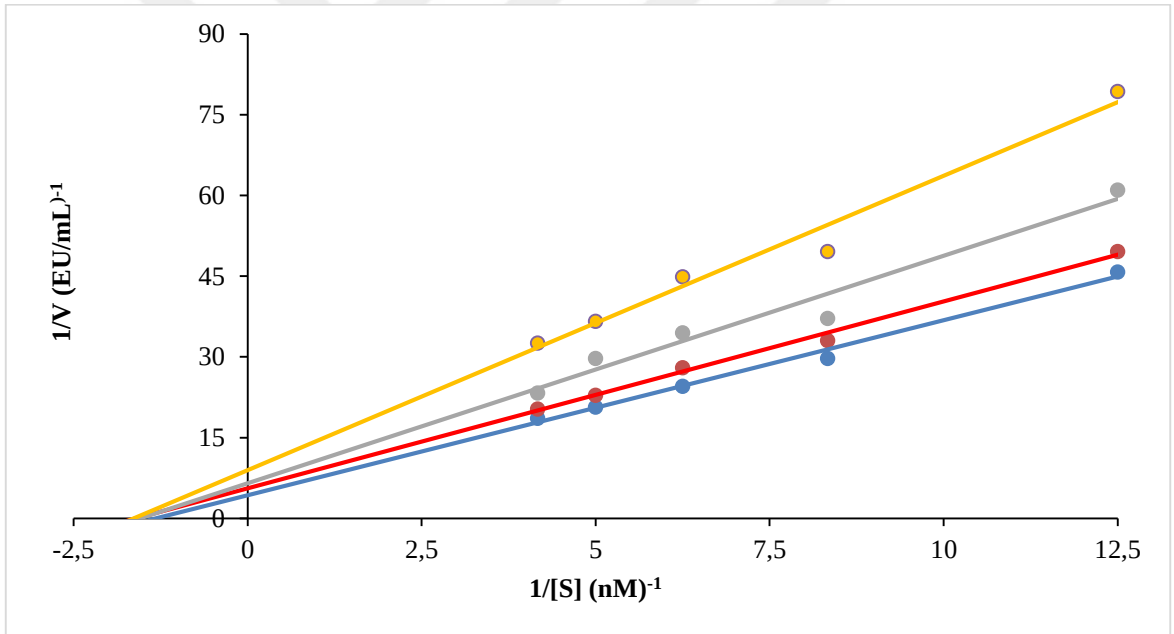
Şekil 23. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin için aktivite (%)-[Proantosiyanidin] grafiği ($r^2:0,9928$)



Şekil 24. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin'in K_i değerini belirlemek için üç değişik derişimde hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği



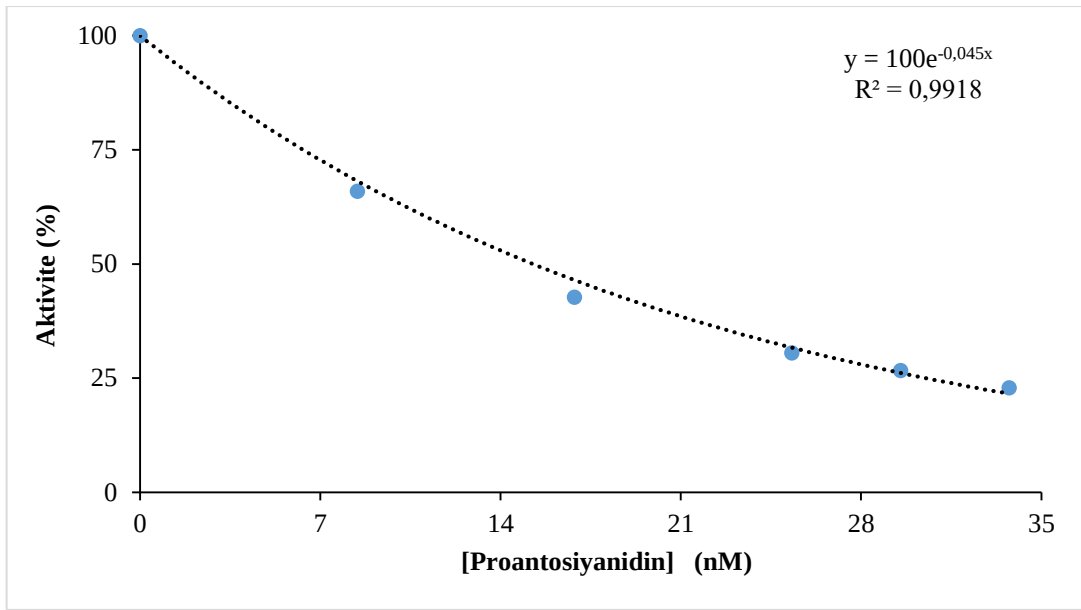
Şekil 25. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin için aktivite (%) - [Fikosiyanin] grafiği ($r^2:0,9943$)



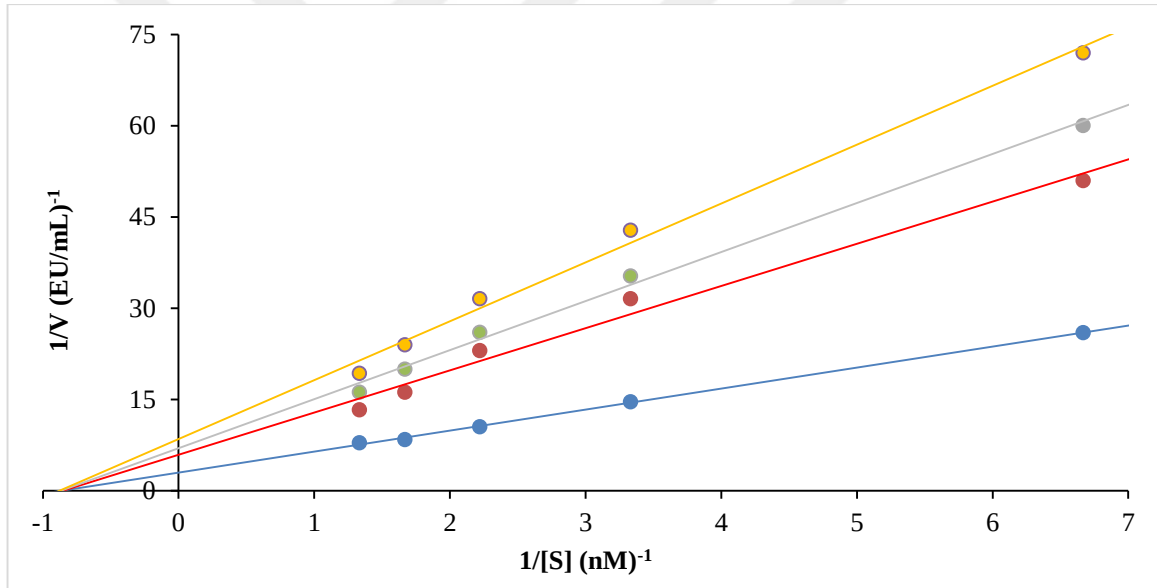
Şekil 26. AChE enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği

hCA izoenzimleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

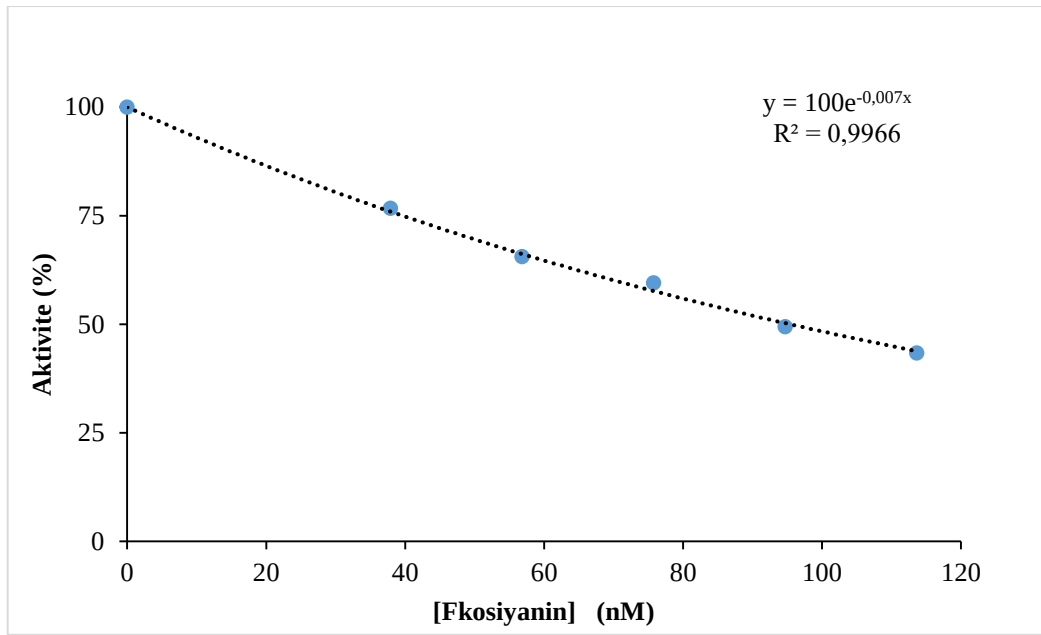
Doymuş PNA substratı konsantrasyonu ile çalışılan hCAI ve hCAII izoenzimlerine proantosiyandin ve fikosiyanin inhibisyon etkileri incelendi. Bu maddelerin için IC_{50} değerleri hesaplanılarak, Lineweaver-Burk grafiklerinden K_i değerleri elde edildi.



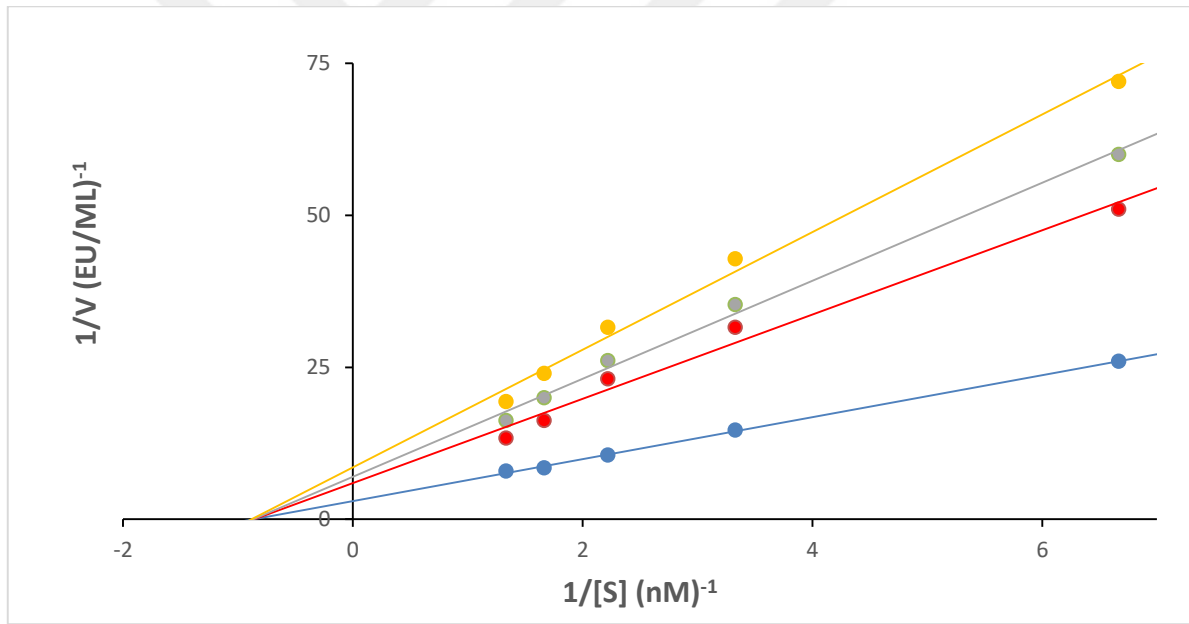
Şekil 27. hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin için aktivite (%)-[Proantosiyanidin] grafiği ($r^2:0,9918$)



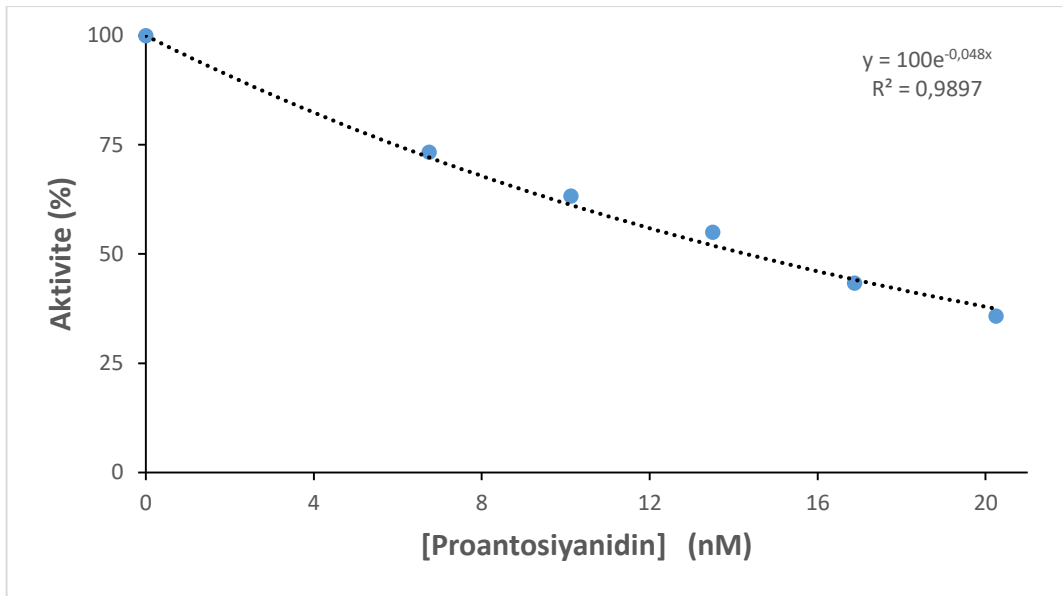
Şekil 28. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin'in K_i değerini belirlemek için üç değişik derişimde hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği



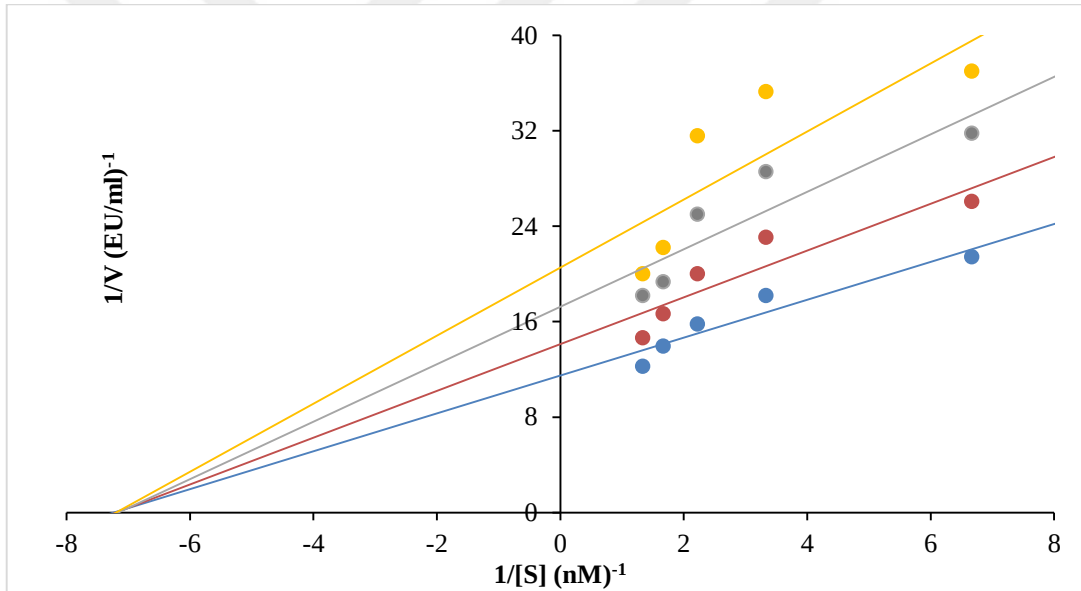
Şekil 29. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin için aktivite (%)-[Fikosiyanin] grafiği ($r^2:0,9966$)



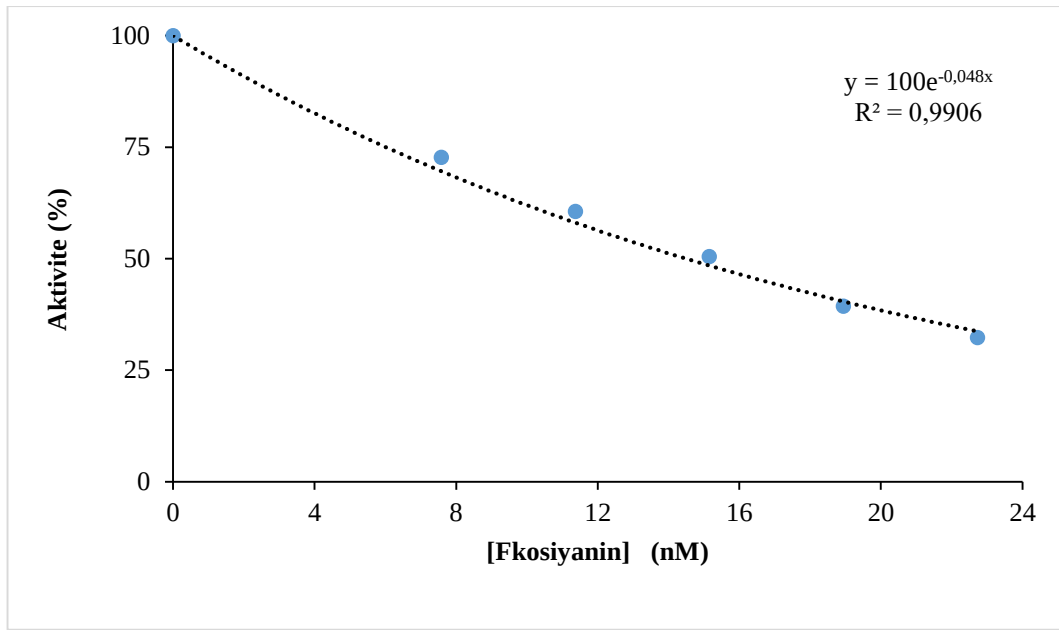
Şekil 30. hCAI izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin'in K_i değerini belirlemek için üç farklı konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği



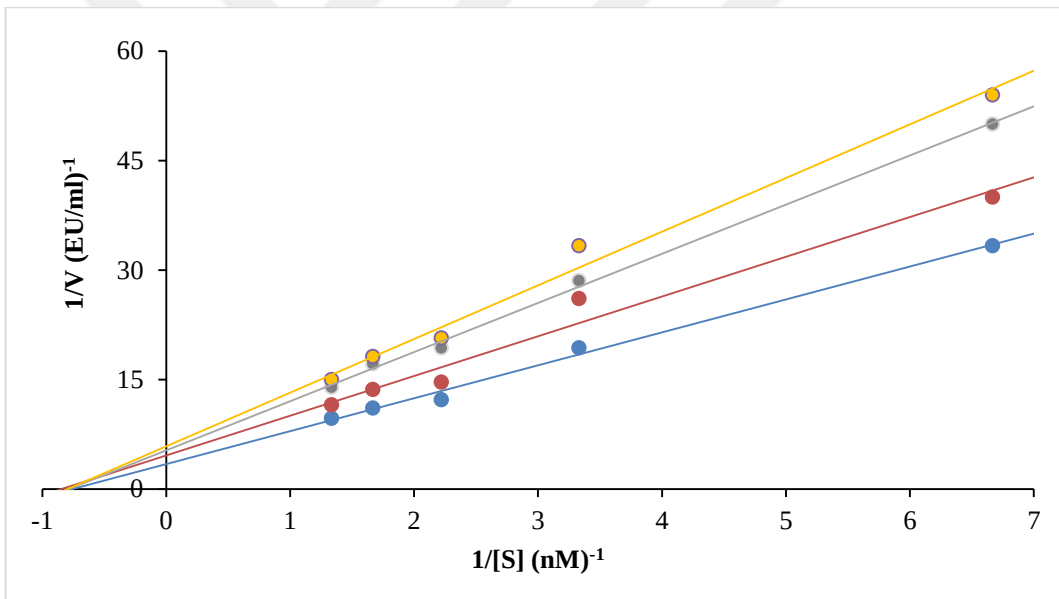
Şekil 31. hCAII izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin için aktivite (%)-[Proantosiyanidin] grafiği ($r^2:0,9897$)



Şekil 32. hCAII izoenzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin'in K_i değerini belirlemek için üç değişik konsantrasyonunda hazırlanan Lineweaver-Burk grafiği



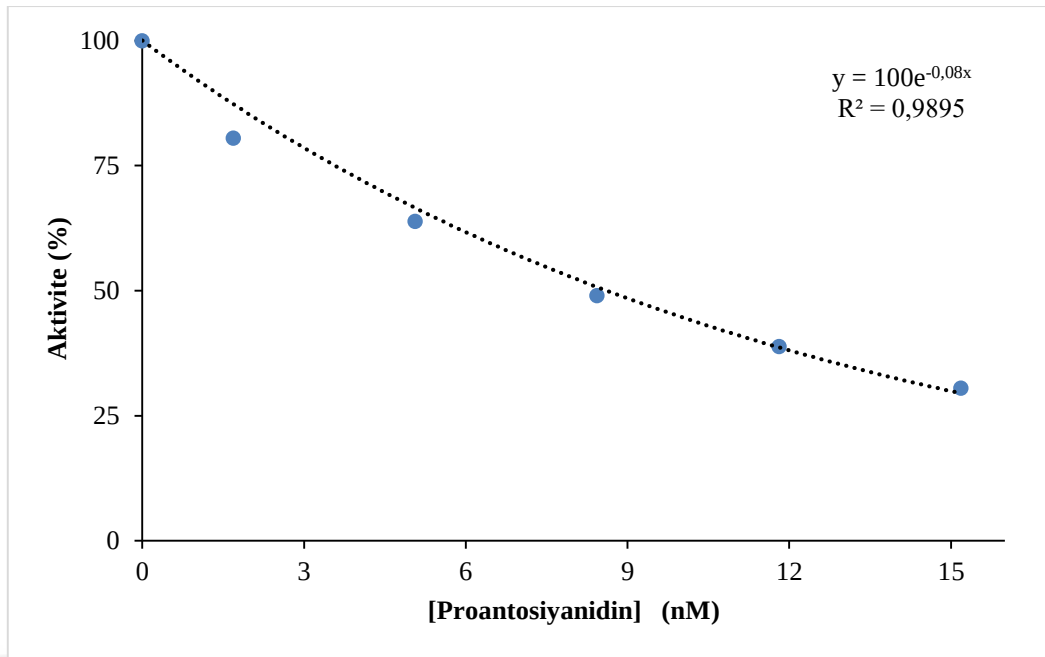
Şekil 33. hCAII izoenzimi ile inhibisyon etkisi gösteren Fikosiyanin için aktivite (%) - [Fikosiyanin] grafiği ($r^2:0,9897$)



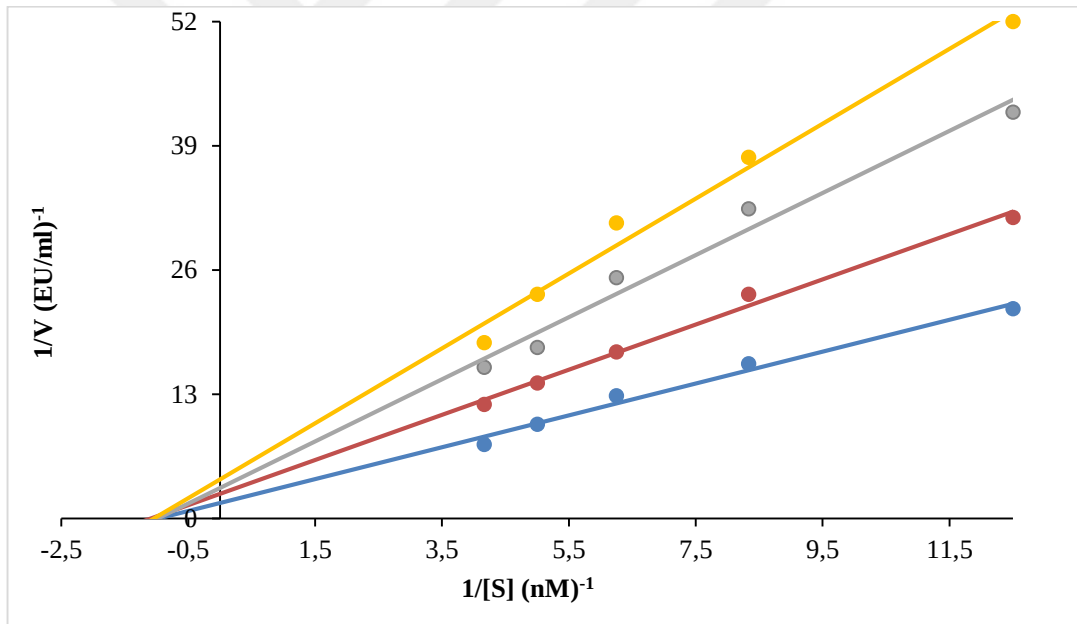
Şekil 34. Fikosiyanin hCAII kullanılarak üç değişik derişimde çizilmiş Lineweaver-Burk grafiği

α -Glikozidaz inhibisyonu ve sonuçları

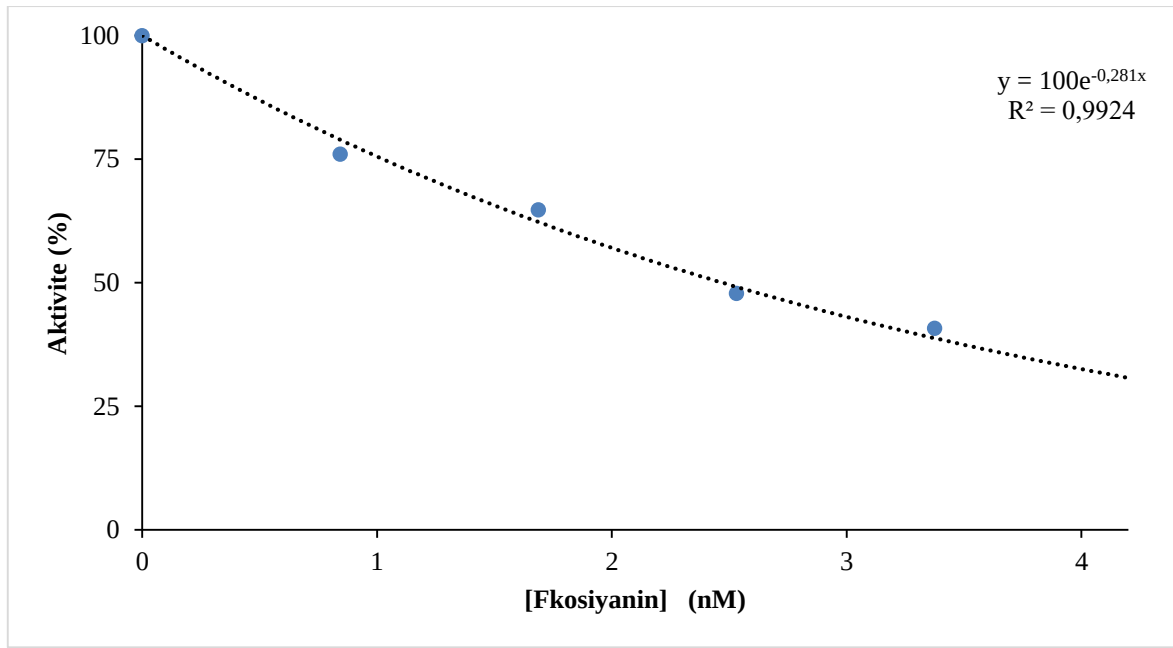
Substrat konsantrasyonu olarak doymuş çözeltiye α -Glikozidaz enzimi ile birlikte sırasıyla proantosyanidin ve fikosiyanin eklenmiştir. Bu maddelerin α -glikozidaz üzerine inhibisyonuna bakıldı. İnhibisyon etki gösteren her madde için IC_{50} değeri bulunarak aktivite (%) ve K_i grafikleri çizildi.



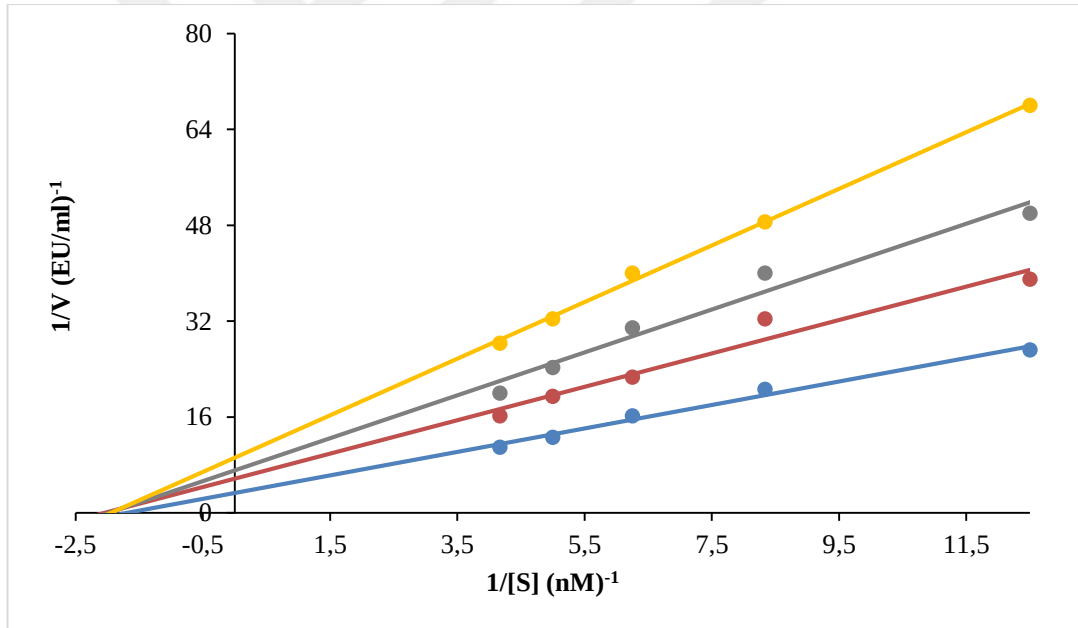
Şekil 35. α-Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren Proantosiyanidin için aktivite (%) - [Fikosiyanin] grafiği ($r^2:0,9895$)



Şekil 36. Proantosiyanidin'in α-Glikozidaz enzimi kullanılarak üç değişik substrat derişiminde çizilmiş Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 37. α-Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon gösteren Fikosiyanin için aktivite (%) - [Fikosiyanin] grafiği ($r^2:0,9924$)



Şekil 38. Fikosiyanin'in α-Glikozidaz kullanılarak üç değişik substrat konsantrasyonuyla çizilmiş Lineweaver-Burk grafiği

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında öncelikle taze insan eritrositlerinden metabolik açıdan oldukça önemli birer enzim olan hCA I ve hCA II izozimleri Sefaroz-4B-L-Tirozin afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma yöntemi olarak ise kullanıldı. Her iki izoenzimin yanı sıra ve ticari olarak satın alınan asetilkolinesteraz, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine Proantosiyanidin ve Fikosiyanın'ın inhibisyon potansiyelleri araştırıldı. Sonuçlar en az birer standart olan Asetezolamid, Takrin ve Akarboz ile karşılaştırıldı.

Detaylı bir literatür taraması yapıldığında CA izoenzimlerin pek çok dokudan saflaştırıldığı karakterize edildiği ve inhibisyon çalışmalarında kullanıldığı görülmektedir. CA izoenzimlerinin fizyolojik olarak metabolizma birçok fonksiyonlarının olmasının yanısıra asit-baz düzenlenmesi şeklindeki pH düzenleme fonksiyonu da son derece önemlidir. Bu fonksiyonlar çok hızlı bir şekilde ve gerektiğinde tersinir olarak da gerçekleştirmeyi CO_2 , HCO_3^- ve H^+ dönüşümü reaksiyonlarından sağlamaktadır (Gülçin ve ark. 2020; Çoban ve ark. 2007). Hâlbuki enzimatik olarak gerçekleştirilen bu reaksiyonun hızı CA varlığında enzimsiz olan reaksiyona nisbeten 10^4 - 10^6 kat arasında hızı artmaktadır (Gülçin ve ark. 2020). İnsan kanında monomerik yapıda olan her iki CA izoenzimin polipeptid zincirlerinde disülfid bağı içermemedikleri için de oldukça ilgi çekmektedir (Akıncıoğlu ve ark.. 2014).

Kromatografi işlemler bir karışımda bulunan çok sayıdaki bileşiğin birbiriyle karışmayan ve farklı olan iki faz arasında dağılım esasına dayanılarak yapılan ayrışmaları sağlayan etkili bir ayırma yöntemidir. Mevcut iki fazdan bir tanesi gözenekli bir yapıda olup film veya tabaka şeklinde iken, hareketsiz bir yapıda iken; diğeri faz ise sabit fazın üzerinde akan veya hareket eden farklı bir fazdır (Atasever ve ark. 2015). Kromatografi, başta kimya olmak üzere, gıda, tıp, biyoloji ve çevre gibi birçok disiplinde yaygın olarak kullanılan ve yararlanılan bir ayırma tekniğidir. Kromatografi çeşitleri arasında afinite, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere dört ana kromatografik ayırma tekniği mevcuttur.

Biyomoleküllerin iyonik kuvvet, pH, tuz, sıcaklık, çözücüler ile çöktürmek gibi geleneksel ayrılma yöntemlerine dayanan ayırma metotları zamanla yerini afinitie gibi biyolojik özelliklere dayalı daha yüksek ayırma potansiyeline sahip metotlara bırakmıştır.

Afinite kromatografisi absorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması düşünülen biyomolekölün matriks adi ve reilen bir kolon materyaline kovalent şekilde immobilize edilmiş

yani sabitleştirilmiş ve ligant denilen bir komplementer bağlanma bileşiğine tersinir ve spesifik olarak bağladığı bir ayırma tekniğidir (Keha and Küfrevioğlu). Ligand ile hedef biyomolekül arasındaki etkileşimler, elektrostatik çekimler veya hidrofobik interaksionlar, van der Waals bağı veya H bağları ile meydana gelebilmektedir. Hedef biyomolekülün kolon ortamından elüsyonu ise yarışmacı bir ligandın molekülünün kullanılması veya ortamın yani mobil fazın iyonik şiddet, pH veya polaritesinde değişimler yapılarak sağlanır. Saflaştırılması istenilen biyomolekülün kolondan elüsyonu esnasında kullanılan mobil faz, biyomolekü denatüre etmemeli ve biyomolekülün spesifik fonksiyonunda veya iş gören aktivitesinde herhangi bir kalıcı yani dönüşümsüz değişime meydan vermemelidir. Bununla beraber afinite kromatografisinde kullanılan matriksine bağlanan ligandın afiniteye tekniğine uygun bir şekilde seçilmesi gerekir. Bu durum kolona paketlenen materyalinden başarılı bir ayırım gerçekleşmeyi sağlayan önemli bir faktördür. Ayrıca, saflaştırılması istenilen biyomolekülün bulunduğu karışım, afinite kolonundan biyomolekül ile ligandın kenetlenmesini sağlayacak doğru bir iyonik şiddet, pH tampona ile mobil fazın eşliğinde geçirilerek sağlanır. Mevcut çalışmamızda taze olarak temin edilen insan kanından eritrositler çöktürülerek ayrıldı, soğuk suda hemoliz edildi. Hemolizat yeni hazırlanmış ve dengelenmiş Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna tatbik edildi, utakrar yıkandı ve hCA I ile hCA II izoenzimleri farklı iyonik şiddetlere sahip elüsyon çözeltileri ile elüe edildi. Protein ve aktivite tayinleri yapıldı, her iki enzim de yüksek saflıkta ve verimde elde edildi. Daha sonra inhibisyonlar başta epilepsi ve gluokoma ile ilintili olan her iki enzim üzerinde Proantosiyanidin ve Fikosiyanın'ın inhibisyon potansiyelleri araştırıldı. Çalışmalardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde Proantosiyanidin ile Fikosiyanın'ın hCA I ve II izoenzimlerini inhibisyon potansiyelleri araştırıldı.

Proteinlerin kromatografik metotlar kullanılarak saflaştırılması işlemleri 1960'lerden itibaren yapılmaya başlandı. Daha öncesinde proteinleri bulundukları ortamdan ayırabilmek için küçük partiküllü sistemlerBu işlemler günümüzde çok yüksek performanslı sıvı kromatografisi veya afiniti kromatografisi olarak adlandırılan teknikleri yüksek saflıklarda yapılabilir. Proteinleri özelliklerine bağlı olarak uygun bir şekilde ayırmak için çeşitli reçineler ve kolon materyalleri üretilmiştir. Bu amaçla kolon kromatografisinde kullanmak üzere ilk olarak 1935 yılında iyon değiştirici materyal ve reçineleri geliştirilmiş, fakat bunların proteinleri ayrılmasında kullanımları 16 yıl sonra yani 1951 yılını bulmuştur. Bu kullanımdan sonra afinite materyal ve reçineleri ise 1960'larda, hidrofobik reçineler de 1970'lerde geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır.

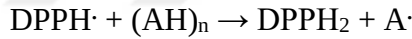
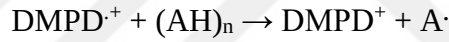
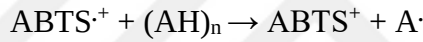
Her iki izoenzim de afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemine başlamak için öncelikle afinite jeli olarak kullanılan Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamit materyalinin kenetlenmesi sağlandı yani sentezlendi. Matriks olarak Sepharose-4B kolon dolgu maddesi olarak seçildi. Matriksin aktifleştirilmesinde CNBr kullanıldı. Aktifleştirilen bu jele enzim ile matriks aranda herhangi bir etkileşmenin olmaması için L-Tirozin amino asidi uzantı kolu eklendi. Ardından sülfanilamid diazollanarak uzantı koluna kenetlendirildi. Sülfanilamid maddesi CA yani karbonik anhidraz enzimine spesifik inhibitör olduğundan sentezlenen jelde ligant olarak kullandı. Afinite jelinde uzantı kolu olarak seçilen L-Tirozin, enzimin matriks olarak kullanılan Sepharose-4B ile etkileşimine engel olmak ve bunun yanı sıra ligand olarak kullanılan sülfanilamid ile daha kuvvetli etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Göçer ve ark. 2017).

Fenolik asit ve türevlerindeki antioksidan aktivitesi irdelendiğinde, aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısına ve konumuna, aromatik halkadaki hidroksil gruplarının bağlanma yerine ve karşılıklı konumuna ve sübstitüentlerin tipine bağlı olduğu bildirilmiştir (Rice-Evans *et al.* 1996; Sroka and Cisowski 2003; Gülcin 2012). Fenolik asitlerle ilgili antioksidan aktiviteleri irdelendiğinde, hidroksisinamik asitlerin hidroksibenzoik asitlerden daha etkili antioksidanlar olduğunu gözlemlemek mümkündür. Bu durum, halkanın çift bağları yoluyla sinamik asit yapısının $-CH=CH-COOH$ 'ye konjugasyonundan kaynaklanmaktadır, bu da serbest radikalleri stabilize etme kabiliyetini artırır. Sinamik asitlerde $-CH_2=CH-COOH$ grubunun varlığı, benzoik asitte $-COOH$ grubundan daha yüksek miktarda antioksidan kapasite sağlar (Cuppert *et al.* 1997). Fenol omurga yapısında birbirinden farklı sübstitüentlerin mevcudiyeti, antioksidan niteliklerini, bilhassa da hidrojen verme yeteneklerini modüle eder. Genel olarak, ikame edilmemiş fenol hidrojen donörü olarak inaktiftir ve monofenol, polifenolden daha az etkili bir antioksidandır. Hidroksil grubu gibi elektron veren grubun orto veya para pozisyonuna eklenmesi fenol veya fenolik asidin antioksidan aktivitesini artırır (Chimi *et al.* 1991). Genel olarak, unsubstitue fenoller hidrojen donörü olarak inaktiftir ve monofenoller, polifenollerden daha az antioksidan aktivite gösterir. Ayrıca hidroksil grubu gibi elektron veren grubun orto- veya para- pozisyonuna eklenmesi fenol veya fenolik asidin antioksidan aktivitesini artırır (Chimi *et al.* 1991). Lakton, aromatik asit veya ester türevi bir karbonil grubunun varlığı, antioksidan aktivitesini arttırdı. Moleküllerin antioksidan etkinliği, karbonil grubu aromatik halkadan kopunca da artmaktadır. Bu nedenle, sinamik asitler, karşılık gelen benzoik asitlerden daha etkili antioksidanlardır. Metoksi grupları gibi komşu bir inert grup tarafından fenolik hidroksil gruplarının sterik engellemesi, antioksidanların etkinliğini arttırdı (Dziedzic and Hudson 1984; Göçer ve Gülcin 2011).

Proantosiyanın günümüzde gıda ve farmasötik kimyada üretilen ürünlerin başta raf ömrünün uzatılmasında da büyük önem taşımaktadır. Raf ömrü için sentetik antioksidanlar yaygın olsada kısmi yan etkilerinden ötürü doğal antioksidan maddelere ilgi artmaktadır. Tez çalışmasında kullandığımız fenolik birleşikler olan Proantosiyanın ve Fikosiyanın maddelerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek için kullanılan metotlar:

- 1- DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi
- 2- ABTS⁺ Radikal Giderme Aktivitesi
- 3- DMPD⁺ Radikal Giderme Aktivitesi
- 4- Cu²⁺ -Cu⁺ (Kuprak Metodu)
- 5- Fe³⁺ - Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi

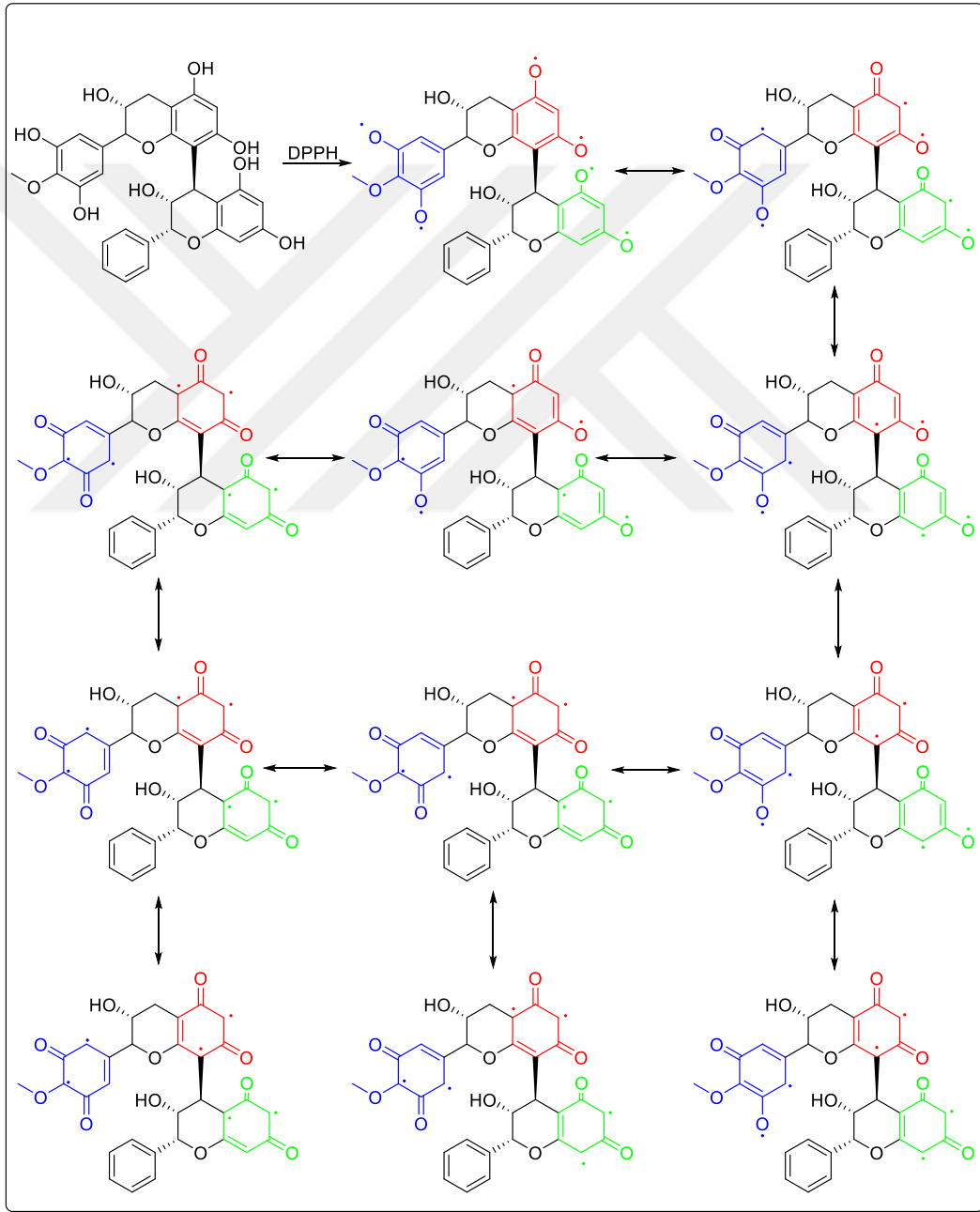
Çalışmamızda radikal giderme kapasitelerini belirlemesinde DPPH, ABTS⁺ ve DMPD⁺ giderme metotları uygulandı. Uygulanan bu yöntemlerin seçici, kolay, hızlı, tekrarlanabilir olması bu metotların kullanım için avantajlarını arttıran temel sebeplerdir. ABTS⁺, DMPD⁺ ve DPPH[•] içeren çözeltilerine antioksidan ilavesiyle reaktif türler indirgenerek renksiz ürünlere dönüşürler.



Oldukça etkili bir DPPH radikal giderme özelliğine sahip olan Proantosiyanın yüksek konsantrasyonda çözücü ortamında bulunması durumunda Şekil 39’da gösterildiği gibi birden fazla DPPH radikalini mevcut beş farklı fenolik –OH gruplarından dolayı birden fazla DPPH radikalini rezonans yapısından dolayı gidermesi mümkündür. Bu durumda Şekil 39’da muhtemel radikal giderme mekanizmasında verildiği gibi bir Proantosiyanın molekülü aynı anada birçok farklı DPPH radiklaini gidererek, Proantosiyanın molekülünde bulunan konjuge çift bağları sayesinde molekül üzerinde dağıtarak söndürüebilmektedir. Bu durumu Fikosiyaninde gözlenmemektedir. Fikosiyanın sadece karoten benzeri alifatik omurga üzerinde konjuge dien yapısından dolayı özellikle hidrofilik ortmada giderilmesi daha etkili olan ABTS radikallerini gideremedi bu başarıyı yakalayabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız proantosiyanın IC₅₀ değeri 9,6 µg/mL iken fikosiyanın IC₅₀ değeri 63 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu değer standartlar karşılaştırılmıştır.

Tablo 9. Radikal Giderme Metotlarında Prontosiyanidin, Fikosiyanin ve Standard Antioksidanlara ait IC₅₀ Değeri

Antioksidanlar	DPPH· Giderme (λ ₅₁₇)	ABTS ⁺ giderme (λ ₇₃₄)	DMPD ⁺ giderme (λ ₅₀₅)
BHA	15,06	9,00	36,47
BHT	20,38	10,50	49,50
α-Tokoferol	12,83	-	-
Troloks	9,36	8,88	18,23
Prontosiyanidin	7,61	9,60	27,72
Fikosiyanin	40,76	63,00	57,75



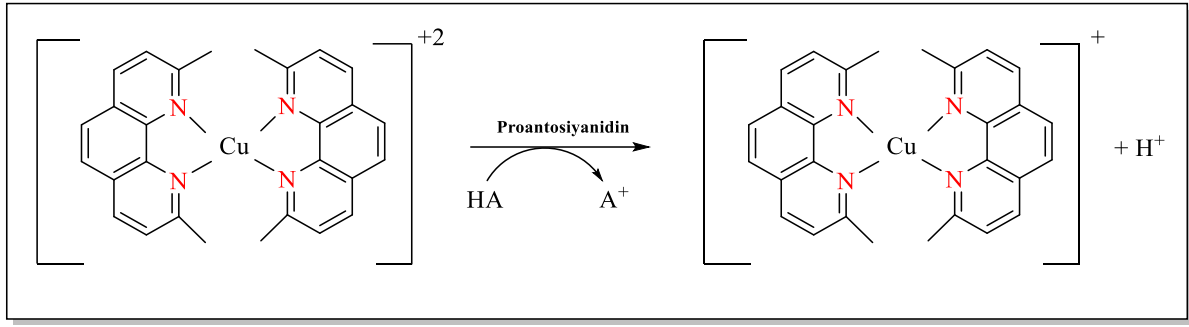
Şekil 39. Proantosiyanidin'in muhtemel DPPH radikal giderme mekanizması

Tablo 10. Antioksidan Maddelerin 45 µg/mL Konsantrasyonda İki İndirgeme Metodu İle Karşılaştırılması

Antioksidanlar	Fe ³⁺ indirgeme	r ²	Cu ²⁺ indirgeme	r ²
BHA	2,423	0,9814	1,649	0,9584
BHT	0,872	0,9864	1,172	0,9834
α-Tokoferol	0,940	0,9856	1,141	0,9934
Troloks	1,743	0,9809	1,413	0,991
Fikosiyanin	0,115	0,9311	0,146	0,953
Proantosiyanidin	1,392	0,9944	1,622	0,9777

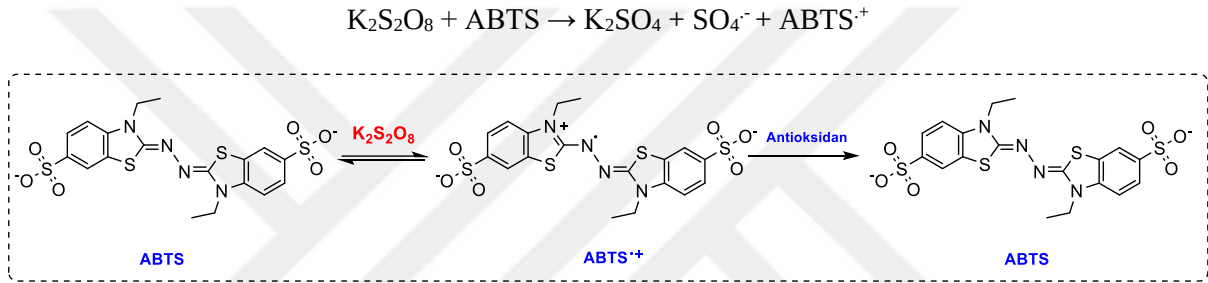
Bu yöntemler sayesinde Proantosiyanidin ve Fikosiyanin maddelerinin antioksidan kapasiteleri belirlendi. Kıyaslama için ise BHA, BHT, Troloks ve α- Tokoferol maddeleri kullanıldı. Antioksidan maddelerde indirgeme kapasitesini saptamak için Cu²⁺-Cu⁺ (kuprak metodu) ve Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi olmak üzere iki yöntemle çalışma yapıldı. Farklı konsantrasyon ile yapılan denemelerde konsantrasyon miktarı artışı ile indirgeme miktarları arttığı gözlemlenmiştir. Fe³⁺-Fe²⁺ metodunda fikosiyanin kıyaslama yapılan maddelere göre indirgeme kapasitesi az olsada proantosiyanidin kıyaslama yapılan maddelerin birçoğundan daha iyi indirgemeye sahip olduğu saptanmıştır. Demir indirgeme sonuçları irdelendiğinde, proantosiyanidin için BHA > Troloks > Proantosiyanidin > α- Tokoferol > BHT şeklinde bir sıralama ve fikosiyanin için ise BHA > Troloks > α- Tokoferol > BHT > Fikosiyanin şeklinde bir sıralama bulundu.

Kuprak metodunun esası ise antioksidanların kuprik iyonlarını kupröze indirgenmesi esasına dayanır ve oluşan kupröz iyonlarının neokurinle oluşturduğu kompleks ise 450 nm’de maksimum absorbans verir. Cu²⁺-Cu⁺ metodunda fikosiyanin kıyaslama yapılan maddelere göre indirgeme kapasitesi az olsada bu kıyaslama proantosiyanidin için yapıldığında daha iyi indirgemeye sahip olduğu saptandı ve BHA > Proantosiyanidin > Troloks > BHT > α- Tokoferol şeklinde sıralandı. Bu metotta oluşan Cu²⁺-Neokuprin kompleksinin daha düzgün tetrahedral yapıda olması sebebiyle Cu⁺-Neokuprin kompleksine göre moleküler gerginliği daha da azalmış ve stabil hale gelmiştir (Apak *et al.* 2006). Oluşan renkli Cu⁺-Neokuprin kompleksi Şekil 36’da gösterilmiştir. Mevcut çalışmada kullanılan iki indirgeme metodunda indirgeme kuvvetinin konsantrasyona bağlı bir şekilde artış gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 40. Cu^{2+} -Neokuprin kompleksinin Proantosiyanidin gibi bir antioksidan molekülün varlığında indirgenme reaksiyonu

Bu çalışmada ABTS'den bir oksidan ajan olan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ varlığında $\text{ABTS}^{\cdot+}$ oluşumu sağlandı. Bu şekilde proantosiyanidin ve fikosiyaniini içeren antioksidan moleküllerin elde edilen ABTS radikalini giderme aktiviteleri 734 nm'de absorbans değeri ölçüldü.



Şekil 41. Bir oksidan olan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ oksidan varlığında $\text{ABTS}^{\cdot+}$ oluşum ve giderme

Çalışmamızda kullanılan diğer yöntem ise $\text{DMPD}^{\cdot+}$ radikal süpürme aktivitesidir. 505 nm'de absorbans vermektedir. Proantosiyanidinin ve fikosiyaniin IC_{50} değerleri sırasıyla 27,72 $\mu\text{g/mL}$ ve değeri 57,75 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. 45 $\mu\text{g/mL}$ kullanılıp bu sonucu veren örneklerle standartlar karşılaştırılmıştır.

CA izoenzimleri I ve II'nin saflaştırma çalışmalarının ardından Proantosiyanidin ve fikosiyaniin bu iki izoenzim üzerindeki inhibisyon etkileri esterase aktivitesikullanılarak gerçekleştirildi. İnhibisyon etkisi gösteren Proantosiyanidin, fikosiyaniin moleküllerin inhibisyonlarına ait IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak belirlendi. Enzimin mevcut aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak bilinen IC_{50} değerinin belirlenmesinde beş ayrı inhibitör konsantrasyonu çalışılarak ölçüm yapıldı. Aktivite (%) - [Proantosiyanidin veya fikosiyaniin] grafikleri çizilerek IC_{50} değeri belirlendi. Bu çalışmada hCA I izoformuna karşı proantosiyanidin IC_{50} değeri 15,4 ng/mL ve fikosiyaniin IC_{50} değeri 99,02 ng/mL bulunmuştur. Diğer taraftan aynı şartlarda çalışılan asetazolamid K_i değeri ise 10,18 ng/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 11. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin CA I İzofrmu İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC ₅₀ ng	r ²	K _i	İnhibisyon türü
Fikosiyanin	99,02ng	0,9966	24,22±1,495	Yarışmasız
Proantosiyadin	15,4ng	0,9918	5,3019±0,0996	Yarışmasız
Asetazolamid	16.58ng	0,9902	10,18±2,77	Yarışmasız

Diğer taraftan glukoma hastalığında ciddi etkileri olan hCA II izozimin inhibisyonuna yönelik yapılan çalışmalarda tez kapsamında kullandığımız maddeler olan prantosiyanidin IC₅₀ değeri 14,44 ng/mL ve fikosiyanin IC₅₀ değeri ise 14,44 ng/mL bulunmuştur. Buna karşılık aseazolamid bu sitozolik hCA II izoformunu 10,18 ng/mL'lık bir IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği gözlenmiştir.

Tablo 12. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin CA II İzofrmu İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC ₅₀ (ng/mL)	r ²	K _i (ng/mL)	İnhibisyon türü
Fikosiyanin	14,44	0,9906	20,94±8,04	Yarışmasız
Proantosiyadin	14,44	0,9897	27,35±1,89	Yarışmasız
Asetazolamid	8.37	0,9912	10,18±2,77	Yarışmasız

Diğer enzim inhibisyon çalışmasında ise ticari olarak elektrik balığında saflaştırılarak temin edilen AChE enzimidir. İnsan metabolizmasında, vücut sıvıları ve plazma başta olmak üzere birçok dokuda bulunan AChE enzimi önemli kolinerjik fonksiyonlara sahiptir. AChE, belirtilen dokularda asetilkolinin kolin molekülünü asetata hidroliz etme görevini yapmaktadır (Köse ve ark. 2015). AChE tez çalışması kapsamında kullandığımız maddeler prantosiyanidin ve fikosiyaninin inhibisyonuna ait IC₅₀ değerleri sırası 15,75 ve 18,24 ng/mL olarak bulunmuştur. AChE inhibitörleri, nörotransmitterlerin sinapslarda kalmasını sağlamak için, astilkolini parçalayan AChE'ın inhibe ederler.

Tablo 13. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin AChE İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC ₅₀ (ng/mL)	r ²	K _i	İnhibisyon türü
Fikosiyanin	18,24	0,9943	18,84±3,13	Yarışmalı
Proantosiyadin	15,75	0,9828	8,93±1,72	Yarışmalı
Takrin	4.88	0,9965	3,95±0,5	Yarışmalı

Diyabetes mellitus (DM) pankreastan salgılanan insülin hormonunun ya tamamen veya kısmen azaldığı ya da yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan kronik bir metabolik hastalık olarak bilinir. DM tedavisinde α -glikozidaz inhibitörleri en çok araştırma konusu haline gelmiştir. Bu enzim inhibitörleri sayesinde polisakkaritlerin glukoza parçalanması

yavaşlamakta veya engellenmekte ve bu şekilde glukozun ince barsaktan emilimi gecikmektedir. α -Glikozidaz inhibisyonuna yönelik çalışmamızda kullandığımız maddelerden prantosiyanidin ve fikosiyaninine ait IC_{50} değeri 8,66 ve 2,46 ng/mL bulunmuştur.

Tablo 14. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin α -glikozidaz İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC_{50} ng	r^2	K_i	İnhibisyon türü
Fikosiyanin	2,46 ng	0,9924	$1,91 \pm 0,66$	Yarışmasız
Proantosiyadin	8,66 ng	0,9897	$8,36 \pm 0,55$	Yarışmasız
*Akarboz	22,8 ng	0,9920	12600 ± 78	Yarışmasız

*Standart bir inhibitör olarak kullanılan Akarboz α -glukozidaz enzimi için referanstan alındı (Gülçin *et al.* 2020a).

α -Amilaz ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmada Xiao ve arkadaşlarının belirledikleri prosedüre göre gerçekleştirildi (Xiao *et al.* 2006). α -Amilaz inhibisyon için yapılan çalışmaların abrobans değerleri 580 nm’de kayd edildi. α -Amilaz inhibisyonuna yönelik tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmamada kullandığımız maddeler olan prantosiyanidin ve fikosiyanin maddelerine ait IC_{50} değeri sırasıyla 3,55 ve 11,76 ng/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 15. Proantosiyanidin İle Fikosiyaninin α -amilaz İçin Elde Edilen İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC_{50} ng	r^2
Fikosiyanidin	11,74 ng	0,9897
Proantosiyanidin	3,554 ng	0,9842
*Akarboz	10,010 ng	0,9424

*Standart bir inhibitör olarak kullanılan Akarboz α -amilaz enzimi için referanstan alındı (Gülçin *et al.* 2020a).

Sonuç olarak biyolojik açıdan birer önemli biyomolekül olan fikosiyanin ve proantosiyanidin maddeleri birçok metotda standart antioksidan aktiviteleri çalışılmış ve özellikle proantosiyanidin için oldukça iyi sonuçlar akınmıştır. Bu iki aktif molekülün ayrıca Alzheimer hastalığı, deans, epilepsi, glukom ve T2DM başta olmak üzere birçok hastalıkla bağlantılı olan hCAI, hCA II, AChE, α -glikozidaz ve α -amilaz üzerinde oldukça etkili bir şekilde inhibisyon ettiklerine sahip olsukları gözlenmiştir. Bu iki doğal antioksidanlar madde gerek ilaç sanayi ve gerekse gıda endüstrisinde kullanımının yaygınlaştırılması yaygınlaştırılabilir ve günlük kullanımları durumunda obezite, kanser, diyabet, arteroskleroz gibi hastalıkları engellemeye pozitif etkiler gösterebilir.

KAYNAKÇA

- Adam, B., & Yiğitoğlu, M. R. (2012). Tıbbi biyokimya (ss.52-549). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Aggul, A. G., Uzun, N., Kuzu, M., Taslimi, P., & Gulcin, I. (2022). Some phenolic natural compounds as carbonic anhydrase inhibitors: An in vitro and in silico study. *Archiv der Pharmazie*, e2100476.
- Ak, T., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-biological interactions*, 174(1), 27-37.
- Akincioğlu, A., Topal, M., Gülçin, I., & Göksu, S. (2014). Novel sulphamides and sulphonamides incorporating the tetralin scaffold as carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 347(1), 68-76.
- Akmal, M., & Wadhwa, R. (2022). Alpha glucosidase inhibitors. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Aksu, K., Özgeriş, B., Taslimi, P., Naderi, A., Gülçin, İ., & Göksu, S. (2016). Antioxidant activity, acetylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel ureas derived from phenethylamines. *Archiv der pharmazie*, 349(12), 944-954. doi: 10.1002/ardp.201600183.
- Anraku, M., Gebicki, J. M., Iohara, D., Tomida, H., Uekama, K., Maruyama, T., ... & Otagiri, M. (2018). Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. *Carbohydrate Polymers*, 199, 141-149.
- Apak, R., Calokerinos, A., Gorinstein, S., Segundo, M. A., Hibbert, D. B., Gülçin, İ., ... & Arancibia-Avila, P. (2022). Methods to evaluate the scavenging activity of antioxidants toward reactive oxygen and nitrogen species (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 94(1), 87-144.
- Arias, A., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2022). Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 102974.
- Aruoma, O.I., Sun, b., Fujii,h., Neergheen, V.S., Bahorun, T., Kang, K.S., Sung, M.K., Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor oligonol: its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials. *Biofactors*, 27 (1-4) (2006), 245-265.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., & Kufrevioglu, O. I. (2013). One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food chemistry*, 136(2), 864-870.
- Atasever-Arslan, B., Yilancioglu, K., Bekaroglu, M. G., Taskin, E., Altinoz, E., & Cetiner, S. (2015). Cytotoxic effect of extract from *Dunaliella salina* against SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gen Physiol Biophys*, 34(2), 201-7.
- Bal, S., Kaya, R., Gök, Y., Taslimi, P., Aktaş, A., Karaman, M., & Gülçin, İ. (2020). Novel 2-methylimidazolium salts: Synthesis, characterization, molecular docking, and carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitory properties. *Bioorganic chemistry*, 94, 103468.

- Barreiros, A. L., David, J. M., David, J. P., & Queiroz, L. P. (2000). New proanthocyanidine of type A2 and flavonoids from leaves of *Dioclea lasiophylla*.
- Beecher, G. R. (2004). Proanthocyanidins: Biological activities associated with human health. *Pharmaceutical Biology*, 42(sup1), 2-20.
- Bekpinar, S., Vardagli, D., Unlucerci, Y., Can, A., Uysal, M., & Gurdol, F. (2015). Effect of rosiglitazone on asymmetric dimethylarginine metabolism in thioacetamide-induced acute liver injury. *Pathophysiology*, 22(3), 153-157.
- Berns, D. S., & MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical chemical studies. *Chemical Reviews*, 89(4), 807-825.
- Beydemir, S. Ü., & Gülçin, İ. (2004). Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193-197.
- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2000). C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 275(1), 20-25.
- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 285(2), 262-266.
- Bilginer, S., Bardaweel, S. K., Demir, Y., Gulcin, I., & Kazaz, C. (2022). Synthesis, cytotoxicities, and carbonic anhydrase inhibition activities of pyrazoline–benzenesulfonamide derivatives harboring phenol/polyphenol moieties. *Medicinal Chemistry Research*, 1-11.
- Biparva, P., Ehsani, M., & Hadjmohammadi, M. R. (2012). Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 87-94.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(6), 2123-2129.
- Bora, R. E., Bilgicli, H. G., Üç, E. M., Alagöz, M. A., Zengin, M., & Gulcin, İ. (2022). Synthesis, characterization, Evaluation of Metabolic Enzyme Inhibitors and in silico Studies of Thymol Based 2-Amino Thiol and Sulfonic Acid Compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 110134.
- Burks, A. W., Calderon, M. A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., Jutel, M., ... & Akdis, C. A. (2013). Update on allergy immunotherapy: American academy of allergy, asthma & immunology/European academy of allergy and clinical immunology/PRACTALL consensus report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5), 1288-1296.
- Burmaoğlu, S., Kazancioglu, E. A., Kazancioglu, M. Z., Sağlamtaş, R., Yalcin, G., Gulcin, I., & Algul, O. (2022). Synthesis, molecular docking and some metabolic enzyme inhibition properties of biphenyl-substituted chalcone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1254, 132358.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., & Gören, A. C. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. *Food research international*, 51(1), 66-74.

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Casirola, D. M., & Ferraris, R. P. (2006). α -Glucosidase inhibitors prevent diet-induced increases in intestinal sugar transport in diabetic mice. *Metabolism*, 55(6), 832-841. doi: 10.1016/j.metabol.2006.02.011.
- Catarzi, S., Romagnoli, C., Marcucci, G., Favilli, F., Iantomasi, T., & Vincenzini, M. T. (2011). Redox regulation of ERK1/2 activation induced by sphingosine 1-phosphate in fibroblasts: involvement of NADPH oxidase and platelet-derived growth factor receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(4), 446-456. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.01.005.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.
- Cherian, P., & Ganga, S. Exploration of Medicinal Foods for Nourishing Natural Health. *Local Food and Community Empowerment through Tourism*, 44.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *The Journal of American's Oil Chemistry Society* 68:307–312.
- Comunian, T. A., Ravanfar, R., de Castro, I. A., Dando, R., Favaro-Trindade, C. S., & Abbaspourrad, A. (2017). Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by Microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. *Food chemistry*, 233, 125-134. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.085.
- Cuppett, S., Schnepf, M., Hall, C., (1997) Natural antioxidant—are they a reality? Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. *AOCS Press*, Champaign
- Çakmakçı, S., Topdaş, E. F., Kalın, P., Han, H., Şekerci, P., P. Köse, L., & Gülçin, İ. (2015). Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*E laeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(2), 472-481.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., & Ekinçi, D. (2007). Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 30(12), 2257-2261.
- Çoban, Ö. E., & Patır, B. (2010). Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2), 7-19.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.
- D'Ascenzio M., Guglielmi P., Carradori S., Secci D., Florio R., Mollica A., Ceruso M., Akdemir A., Sobolev AP, Supuran CT Açık sakarin bazlı ikincil sülfonamidler güçlü ve kanserle ilişkili karbonik anhidraz IX ve XII izoformlarının seçici inhibitörleri. *J. Enzim. Engelle. Med. Kimya* 2017; 32:51-59. doi: 10.1080/14756366.2016.1235040.
- De Jesus Raposo, M. F., De Moraes, A. M. M. B., & De Moraes, R. M. S. C. (2014). Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae. *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology*.
- De la Iglesia, R., Milagro, F. I., Campión, J., Boqué, N., & Martínez, J. A. (2010). Healthy properties of proanthocyanidins. *Biofactors*, 36(3), 159-168.

- De Melo, E. B., da Silveira Gomes, A., & Carvalho, I. (2006). α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302. doi: 10.1016/j.tet.2006.08.055.
- De Monte C., Carradori S., Gentili A., Mollica A., Trisciuglio D., Supuran CT Kanser tedavisi için nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlarla ikili siklooksijenaz ve karbonik anhidraz inhibisyonu. *Kör. Med. Kimya* 2015; 22 :2812–2818.
- Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, J. F.; Tome, D.; Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayer of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2001, 3, 957-967.
- Ding, Y., Zhang, Z., Dai, X., Jiang, Y., Bao, L., Li, Y., & Li, Y. (2013). Grape seed proanthocyanidins ameliorate pancreatic beta-cell dysfunction and death in low-dose streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats partially by regulating endoplasmic reticulum stress. *Nutrition & metabolism*, 10(1), 1-12.
- Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., ... & Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition*, 80(S1), S77-S112.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?. *New phytologist*, 165(1), 9-28.
- Dolatabadi, J. E. N., & Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), 1223-1230.
- Durmaz, L., Erturk, A., Akyüz, M., Polat Kose, L., Uc, E. M., Bingol, Z., ... & Gulcin, İ. (2022a). Screening of Carbonic Anhydrase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, and α -Glycosidase Enzyme Inhibition Effects and Antioxidant Activity of Coumestrol. *Molecules*, 27(10), 3091.
- Durmaz, L., Kiziltas, H., Guven, L., Karagecili, H., Alwasel, S., Gulçin, İ. (2022). Antioxidant, antidiabetic, anticholinergic, and antiglaucoma effects of magnofluorine. *Molecules*, 27, 5902.
- Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F., (1984) Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry* 14:45–51
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903-904.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanina pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 1-14.
- Erlejman, A. G.; Verstraeten, S. V.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radical Res.* 2004, 38, 1311-1320.
- Fitzpatrick, D. F., Bing, B., Maggi, D. A., Fleming, R. C., & O'Malley, R. M. (2002). Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 78-89.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1035-1040.

- Fuji, H., Nakagawa, T., Nishioka, H., Sato, E., Hirose, A., Ueno, Y., Sun, B., Yokozawa, T., Nonaka, G.I., Preparation, characterization, and antioxidative effects of oligomeric proanthocyanidin–L-cysteine complexes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1525–1531.
- Fuji, H., Nakagawa, T., Nishioka, H., Sato, E., Hirose, A., Ueno, Y., Sun, B., Yokozawa, T., Nonaka, G.I., Preparation, characterization, and antioxidative effects of oligomeric proanthocyanidin–L-cysteine complexes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1525–1531.
- Ganesan, P., Sagar, T. G., Dubashi, B., Rajendranath, R., Kannan, K., Cyriac, S., & Nandennavar, M. (2011). Nonadherence to imatinib adversely affects event free survival in chronic phase chronic myeloid leukemia. *American journal of hematology*, 86(6), 471-474.
- Garibov, E., Taslimi, P., Sujayev, A., Bingol, Z., Çetinkaya, S., Gulçin, İ., ... & Supuran, C. T. (2016). Synthesis of 4, 5-disubstituted-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidines and investigation of their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carbonic anhydrase I/II inhibitory and antioxidant activities. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(sup3), 1-9. doi: 10.1080/14756366.2016.1198901.
- Giordano, D., Locatelli, M., Travaglia, F., Bordiga, M., Reyneri, A., Coisson, J. D., & Blandino, M. (2017). Bioactive compound and antioxidant activity distribution in roller-milled and pearled fractions of conventional and pigmented wheat varieties. *Food Chemistry*, 233, 483-491. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.065.
- Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C., Andrade, P. B., Valentão, P., & Romano, A. (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *Journal of food science and technology*, 54(1), 219-227.
- Göçer, H., & Gülçin, İ. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(8), 821-825.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., & Gülçin, İ. (2013). Synthesis, Antioxidant, and Antiacetylcholinesterase Activities of Sulfonamide Derivatives of Dopamine-Related Compounds. *Archiv der pharmazie*, 346(11), 783-792.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., & Gülçin, İ. (2017). Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds. *Arabian journal of chemistry*, 10(3), 398-402.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1989). 1 Iron toxicity and oxygen radicals. *Bailliere's clinical haematology*, 2(2), 195-256.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gülçin, I. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 23(6), 871-876.
- Gülçin, I., Buyukokuroglu, M. E., Oktay, M., & Kufrevioglu, O. I. (2002). On the in vitro antioxidative properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 33(3), 167-171.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., & Büyükokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of ethnopharmacology*, 90(2-3), 205-215.

- Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2006). Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine*, 13(5), 343-351. doi: 10.1016/j.phymed.2005.03.009.
- Gülçin, İ. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 871-876.
- Gülçin, İ. (2009). Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 71-80.
- Gülçin, İ. (2009). Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 71-80. Gülçin, İ. (2009). Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure–activity insight. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 71-80.
- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of eugenol: A structure–activity relationship study. *Journal of medicinal food*, 14(9), 975-985.
- Gülçin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., & Gepdiremen, A. (2005). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of ethnopharmacology*, 101(1-3), 287-293.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., & Boyer, L. (2006). Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology*, 223(6), 759-767.
- Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, H.S., Kılıç, Ö., Bursal, E., 2020a. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Gülçin, İ., Sat, İ., Beydemir, Ş., & Kufrevioglu, Ö. (2004). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of broccoli extracts (*Brassica oleracea* L.). *Italian journal of food science*, 16(1).
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koksall, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., ... & Alwasel, S. H. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1698-1702.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koksall, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., ... & Alwasel, S. H. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1698-1702.
- Günsel, A., Yıldırım, A., Taslimi, P., Erden, Y., Taskin-Tok, T., Pişkin, H., ... & Yarasir, M. N. (2022). Cytotoxicity effects and biochemical investigation of novel tetrakis-phthalocyanines bearing 2-thiocytosine moieties with molecular docking studies. *Inorganic Chemistry Communications*, 138, 109263.

- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, 9(1), 1-32.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- Hannan, P. A., Khan, J. A., Ullah, I., & Ullah, S. (2016). Synergistic combinatorial antihyperlipidemic study of selected natural antioxidants; modulatory effects on lipid profile and endogenous antioxidants. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 1-10. doi: 10.1186/s12944-016-0323-3.
- Harborne, J. B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 335-367.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V., & Hohlberg, A. (1989). Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 1(4), 325-331.
- Hfaiedh, M., Brahmi, D., & Zourgui, L. (2014). Protective role of cactus cladodes extract on sodium dichromate-induced testicular injury and oxidative stress in rats. *Biological trace element research*, 159(1), 304-311.
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., ... & Keen, C. L. (2002). Procyanidin dimer B2[epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American journal of clinical nutrition*, 76(4), 798-804.
- Hou Z., Li C., Liu Y., Zhang M., Wang Y., Fan Z., huang C., Lin B., Liu Y. Karbonhidrat bazlı sülfonamid türevlerinin tasarımı, sentezi ve biyolojik olarak değerlendirilmesi karbonik anhidraz II'nin seçici inhibisyonu yoluyla topikal antiglokom ajanları. *J. Enzim. Engelle. Med. Kimya* 2020; 35, :383-390. doi: 10.1080/14756366.2019.1705293
- Hou, W. C., Lin, R. D., Cheng, K. T., Hung, Y. T., Cho, C. H., Chen, C. H., ... & Lee, M. H. (2003). Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine*, 10(2-3), 170-175.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c.
- Huang, G. L., & Zhihui, S. (2002). Immobilization of *Spirulina subsalsa* for removal of triphenyltin from water. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 30(4), 293-305.
- Huang, Z., Guo, B. J., Wong, R. N. S., & Jiang, Y. (2007). Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 100(3), 1137-1143.
- Hunaiti, A. A., & Abukhalaf, I. K. (1987). A rapid purification procedure for camel kidney glutathione S-transferase. *Preparative biochemistry*, 17(3), 239-259.
- Iahtisham-Ul-Haq, M.S. Butt, A. Shamshad, H.A.R. Suleria (2019). Heath benefits of anthocyanins in black carrot (*Daucus carota*). *Human Health Benefits of Plant Bioactive Compounds: Potentials and Prospects*, 69. Apple Academic Press, New York, USA.
- Innocenti, A., Sarıkaya, S. B. Ö., Gülçin, I., & Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I–XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(6), 2159-2164.
- Karioti, A., Sokovic, M., Ciric, A., Koukoulitsa, C., Bilia, A. R., & Skaltsa, H. (2011). Antimicrobial properties of *Quercus ilex* L. proanthocyanidin dimers and simple

- phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6412-6422. doi: 10.1021/jf2011535.
- Kashanian, S., & Dolatabadi, J. E. N. (2009). DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry*, 116(3), 743-747.
- Kaya, Y., Erçağ, A., Zorlu, Y., Demir, Y., & Gülçin, İ. (2022). New Pd (II) complexes of the bisthiocarbonylhydrazones derived from isatin and disubstituted salicylaldehydes: Synthesis, characterization, crystal structures and inhibitory properties against some metabolic enzymes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 27(2), 271-281.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınları.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2012). *Biyokimya* (ss. 97-125). Erzurum: Aktif Yayınları.
- Kirst, H., Formighieri, C., & Melis, A. (2014). Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochimica et biophysica acta (bba)-bioenergetics*, 1837(10), 1653-1664. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.07.009.
- Köksal, E., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(1), 65-78.
- Köse, L. P., Gülçin, I., Gören, A. C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A. L., & Gorinstein, S. (2015). LC–MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. *Industrial crops and products*, 74, 712-721.
- Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., & Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International*, 59, 41-52. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.046.
- Kulawik, P., Özogul, F., Glew, R., & Özogul, Y. (2013). Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 475-491.
- Lacroix, S., Des Rosiers, C., Tardif, J. C., & Nigam, A. (2012). The role of oxidative stress in postprandial endothelial dysfunction. *Nutrition research reviews*, 25(2), 288-301.
- Lai, R., Xian, D., Xiong, X., Yang, L., Song, J., & Zhong, J. (2018). Proanthocyanidins: novel treatment for psoriasis that reduces oxidative stress and modulates Th17 and Treg cells. *Redox Report*, 23(1), 130-135.
- Lee, B. H., Rose, D. R., Lin, A. H. M., Quezada-Calvillo, R., Nichols, B. L., & Hamaker, B. R. (2016). Contribution of the individual small intestinal α -glucosidases to digestion of unusual α -linked glycemic disaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(33), 6487-6494.
- Lee, S. C., Marzec, M., Liu, X., Wehrli, S., Kantekure, K., Ragunath, P. N., ... & Wasik, M. A. (2013). Decreased lactate concentration and glycolytic enzyme expression reflect inhibition of mTOR signal transduction pathway in B-cell lymphoma. *NMR in Biomedicine*, 26(1), 106-114.
- Leganes, F., Martinez-Granero, F., Muñoz-Martín, M. Á., Marco, E., Jorge, A., Carvajal, L., ... & Fernandez-Pinas, F. (2014). Characterization and responses to environmental cues of a photosynthetic antenna-deficient mutant of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of plant physiology*, 171(11), 915-926.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual review of plant biology*, 57(1), 405-430.

- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z. G., & Ghanbari, H. A. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*, 14(12), 24438-24475.
- Li, X., Bai, Y., Jin, Z., & Svensson, B. (2022). Food-derived non-phenolic α -amylase and α -glucosidase inhibitors for controlling starch digestion rate and guiding diabetes-friendly recipes. *LWT*, 153, 112455.
- Liu, Z. Q. (2022). Why natural antioxidants are readily recognized by biological systems? 3D architecture plays a role!. *Food Chemistry*, 132143.
- Lu, H. K., Hsieh, C. C., Hsu, J. J., Yang, Y. K., & Chou, H. N. (2006). Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *European journal of applied physiology*, 98(2), 220-226.
- Manach, C.; Donovan, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Res.* 2004, 38, 771-785.
- Mao, T. K.; Van De Water, J.; Keen, C. L.; Schmitz, H. H.; Gershwin, M. E. Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Food* 2002, 5, 17-22.
- Mazzio E.A., Harris N., Soliman K.F., Food constituents attenuate oxidase activity and peroxide levels in C6 cells. *Planta Med.* 64 (1998), 603-607.
- Meral, R., Doğan, İ. S., & Kanberoğlu, G. S. (2012). Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2(2), 45-50.
- Michalak, M. (2022). Plant-derived antioxidants: Significance in skin health and the ageing process. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 585
- Min Hu, M.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich extract from grape seed in whey protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5272-5276.
- Mizuno, M., Nakanishi, I., Matsubayashi, S., Imai, K., Arai, T., Matsumoto, K. I., & Fukuhara, K. (2017). Synthesis and antioxidant activity of a procyanidin B3 analogue. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(4), 1041-1044.
- Mohandas, S., & Ramkumar, K. M. (2022). Role of ER stress inhibitors in the management of diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 174893.
- Mollica A., Costante R., Akdemir A., Carradori S., Stefanucci A., Macedonio G., Ceruso M., Supuran CT Yeni Probenesid bazlı karbonik anhidraz inhibitörlerinin araştırılması: Sentez, biyolojik değerlendirme ve yerleştirme çalışmaları. *Bioorg. Med. Kimya* 2015; 23 :5311–5318.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nanditha, B. R., Jena, B. S., & Prabhasankar, P. (2009). Influence of natural antioxidants and their carry-through property in biscuit processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), 288-298.
- Nelson, V., Ziehr, J., Agulnik, M., & Johnson, M. (2013). Afatinib: emerging next-generation tyrosine kinase inhibitor for NSCLC. *OncoTargets and therapy*, 6, 135.
- Newsome, A. G., Culver, C. A., & Van Breemen, R. B. (2014). Nature's palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6498-6511.

- Nguyen, H. T. T., Pokorny, J., & Korczak, J. (1999). Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in rapeseed and sunflower oils. *Czech Journal of Food Sciences-UZPI (Czech Republic)*.
- Oktay, K., Köse, L. P., Şendil, K., Gültekin, M. S., Gülçin, İ., & Supuran, C. T. (2016). The synthesis of (Z)-4-oxo-4-(arylamino) but-2-enoic acids derivatives and determination of their inhibition properties against human carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 939-945.
- Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315.
- Özaslan, M. S., Sağlamtaş, R., Demir, Y., Genç, Y., Saraçoğlu, İ., & Gülçin, İ. (2022). Isolation of Some Phenolic Compounds from *Plantago subulata* L. and Determination of Their Antidiabetic, Anticholinesterase, Antiepileptic and Antioxidant Activity. *Chemistry & Biodiversity*, 19(8), e202200280.
- Öztaşkın, N., Cetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., & Gülçin, İ. (2015). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. *Bioorganic chemistry*, 60, 49-57.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042. doi: 10.1021/np9904509.
- Pokorny, J., & Schmidt, S. (2003). The impact of food processing in phytochemicals: the case of antioxidants. *Phytochemical functional foods*, 298-314.
- Polat Kose, L., Bingol, Z., Kaya, R., Goren, A. C., Akincioglu, H., Durmaz, L., ... & Gülçin, İ. (2020). Anticholinergic and antioxidant activities of avocado (*Folium perseae*) leaves—phytochemical content by LC-MS/MS analysis. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 878-893.
- Prauchner, C. A. (2017). Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns*, 43(3), 471-485.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*. 2014. Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., & Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC cancer*, 15(1), 1-13.
- Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Patel, S., Pan, X., Naz, S., ... & Suleria, H. A. R. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 108999.
- Ravindranathan, P., Pasham, D., Balaji, U., Cardenas, J., Gu, J., Toden, S., & Goel, A. (2018). Mechanistic insights into anticancer properties of oligomeric proanthocyanidins from grape seeds in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 39(6), 767-777.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- Rimbau, V., Camins, A., Pubill, D., Sureda, F. X., Romy, C., González, R., ... & Pallàs, M. (2001). C-phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum

- deprivation-induced apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 364(2), 96-104.
- Rimm, E. B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1996). Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Jama*, 275(6), 447-451.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Romay, C. H., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current protein and peptide science*, 4(3), 207-216.
- Romay, C., Delgado, R., Ramirez, D., Gonzalez, R., & Rojas, A. (2001). Effects of phycoerythrin extract on tumor necrosis factor- α and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. *Arzneimittelforschung*, 51(09), 733-736.
- Romay, C., Ledón, N., & González, R. (1998). Further studies on anti-inflammatory activity of phycoerythrin in some animal models of inflammation. *Inflammation Research*, 47(8), 334-338.
- Sarikaya, S. B. Ö., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, I., & Supuran, C. T. (2011). In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(14), 4259-4262.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Shahidi, F., & Wanasundara, U. (1995). Effect of natural antioxidants on the stability of canola oil. In *Developments in Food Science* (Vol. 37, pp. 469-479). Elsevier.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. Critical reviews in food science & nutrition, 32(1), 67-103.
- Shao, Z. H., Vanden Hoek, T. L., Xie, J., Wojcik, K., Chan, K. C., Li, C. Q., ... & Yuan, C. S. (2003). Grape seed proanthocyanidins induce pro-oxidant toxicity in cardiomyocytes. *Cardiovascular toxicology*, 3(4), 331-339.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, 215(2), 213-219.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1315S-1321S.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of pharmacy research*, 7(9), 828-835.
- Singh, S., Sharma, V., Soni, M. L., & Das, S. (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 486-496.
- Sroka, Z., Cisowski, W., (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41:753–758
- Sundar Rajan, S., Srinivasan, V., Balasubramanyam, M., & Tatu, U. (2007). Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes. *The Indian Journal of Medical Research*, 125(3), 411-24.

- Supuran, C. T., & Scozzafava, A. (2001). Carbonic anhydrase inhibitors. *Current medicinal chemistry-immunology, endocrine & metabolic agents*, 1(1), 61-97. doi: 10.2174/1568013013359131.
- Stone, W. L., Pham, T., & Mohiuddin, S. S. (2022). Biochemistry, antioxidants. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Şehitoğlu, M.H., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., & Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical chromatography*, 27(2), 148-155.
- Taslimi, P., Caglayan, C., & Gulcin, İ. (2017). The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(12), e21995.
- Taslimi, P., Caglayan, C., Farzaliyev, V., Nabiyev, O., Sujayev, A., Turkan, F., ... & Gulçin, İ. (2018b). Synthesis and discovery of potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes inhibitors: The novel N, N'-bis-cyanomethylamine and alkoxymethylamine derivatives. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(4), e22042.
- Taslimi, P., Osmanova, S., Caglayan, C., Turkan, F., Sardarova, S., Farzaliyev, V. & Gulçin, İ. (2018). Novel amides of 1, 1-bis-(carboxymethylthio)-1-arylethanes: Synthesis, characterization, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibitory properties. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(9), e22191.
- Taslimi, P., Sujayev, A., Turkan, F., Garibov, E., Huyut, Z., Farzaliyev, V., ... & Gulçin, İ. (2018a). Synthesis and investigation of the conversion reactions of pyrimidine-thiones with nucleophilic reagent and evaluation of their acetylcholinesterase, carbonic anhydrase inhibition, and antioxidant activities. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(2), e22019.
- Tham, Y. C., Li, X., Wong, T. Y., Quigley, H. A., Aung, T., & Cheng, C. Y. (2014). Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 121(11), 2081-2090.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M. Y., Yano, M., Nakajima, J. I., Awazuhara, M., ... & Saito, K. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal*, 42(2), 218-235.
- Topal, F. (2018). Antidiabetic Potential: Effect of Resorcinol on α -Glycosidase and α -Amylase Enzymes. *Cumhuriyet Science Journal*, 39(4), 828-832.
- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A., & Guney, M. (2017). Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *International journal of biological macromolecules*, 94, 845-851.
- Topal, M., & Gulcin, İ. (2022). Evaluation of the in vitro antioxidant, antidiabetic and anticholinergic properties of rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102417.

- Turkan, F., Çetin, A., Taslimi, P., Karaman, M., & Gulçin, İ. (2019). Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel pyrazole derivatives as potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 86, 420-427.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Vodnar, D. C., Călinoiu, L. F., Dulf, F. V., Ștefănescu, B. E., Crișan, G., & Socaciu, C. (2017). Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food chemistry*, 231, 131-140.
- Wang, N., Xu, H., Jiang, S., Zhang, Z., Lu, N., Qiu, H., ... & Chen, X. (2017). MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *The Plant Journal*, 90(2), 276-292.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch? Iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical biochemistry*, 351(1), 146-148.
- Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D and Dixon RA, Role of antho-cyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosyn-thesis. *Science* 299:396–399 (2003).
- Xie, D. Y., & Dixon, R. A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis—still more questions than answers?. *Phytochemistry*, 66(18), 2127-2144.
- Xiu, F., Stanojcic, M., Diao, L., & Jeschke, M. G. (2014). Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *International journal of endocrinology*, 2014. doi:10.1155/2014/486403.
- Xu, Y., Kua, B.S., Yao, H.Y., Lin, Y.H., Ma, X., Zhang, Y.H., Li, X.J., Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, (2005), 200-206.
- Yan, M., Liu, B., Jiao, X., & Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*, 92(1), 89-97.
- Yang, J. Y., Zhang, H. J., Wang, J., Wu, S. G., Yue, H. Y., Jiang, X. R., & Qi, G. H. (2017). Effects of dietary grape proanthocyanidins on the growth performance, jejunum morphology and plasma biochemical indices of broiler chicks. *Animal*, 11(5), 762-770.
- Yiğit, M., Yiğit, B., Taslimi, P., Özdemir, İ., Karaman, M., & Gulcin, I. (2020). Novel amine-functionalized benzimidazolium salts: Synthesis, characterization, bioactivity, and molecular docking studies. *Journal of molecular structure*, 1207, 127802.
- Yiğit, B., Yiğit, M., Barut Celepci, D., Gök, Y., Aktaş, A., Aygün, M., ... & Gülçin, İ. (2018). Novel benzylic substituted imidazolinium, tetrahydropyrimidinium and tetrahydrodiazepinium salts: potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *ChemistrySelect*, 3(27), 7976-7982.
- Youdim, K.A., Kaiser, M.Z.; Begley, D.J.; Rice-Evans, C.A.; Abbot, N.J. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biol. Med.* 2004, 36, 592-604.
- Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T., & Zhang, Y. (2017). Purification and bioactivities of phycocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3840-3849.
- Zang, X., Shang, M., Xu, F., Liang, J., Wang, X., Mikage, M., & Cai, S. (2013). A-type proanthocyanidins from the stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and their antimicrobial activities. *Molecules*, 18(5), 5172-5189.

- Zang, F., Qin, S., Ma, C., Li, W., & Lin, J. (2020). Preparation of high-purity R-phycoerythrin and R-phyococyanin from *Pyropia yezoensis* in membrane chromatography. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3411-3418.
- Zhang, C. W., Ceng, Z. Q., Zhang, Y. Z., Luo, C. J., Guo, Z. H. and Shi, Y. (1996a). Effect of C-phyococyanin on granulopoiesis and monocytopenia in mice. *Chin. Mar. Pharmaceut.* 60:25–28.
- Zhang, X., Zheng, Y. Y., Hu, C. M., Wu, X. Z., Lin, J., Xiong, Z., ... & Xu, X. T. (2022). Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing oxime ester as α -glucosidase inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(9), 104072.
- Zhong, Z., Li, Y., Abbaspourrad, A., Improvement of the colloidal stability of phycocyanin in acidified conditions using whey protein-phycocyanin interactions. *Food Hydrocolloids*, 105, 2020, 105747.
- Zhou, Z. P., Chen, X. L., Chen, C., & Zhang, Y. Z. (2003). Effect of apoprotein on antioxidant activity of phycobiliproteins. *Marine Sciences*, 27(5), 77-78.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Ahmet Gökhan OLTULU
Doğum Yeri	:
Uyruğu	
Adres	
Tel	
E-mail	
Eğitim	
Lise	: Ilıca Yavuz Selim Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans	: Atatürk Üniversitesi
Yüksek lisans	: Atatürk Üniversitesi
Doktora	:
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	