

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MERYEMANA DİKENİ (*Silybum marianum* L. Gaertner)
TOHUMUNUN ANTIOKSİDANT AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA
HASARI ve PROTEİN OKSİDASYONU ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Aynur SERÇE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Eylül 2012

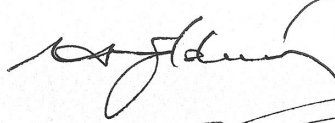
T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Aynur SERÇE tarafından yapılan “Meryemana diken (Silybum marianum L. Gaertner) tohumunun antioksidant aktivitesi, oksidatif DNA hasarı ve protein oksidasyonu önleyici etkisinin araştırılması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

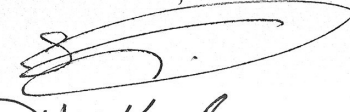
Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

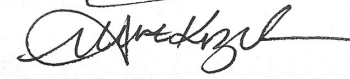
Başkan: Prof. Dr. Çetin AYTEKİN



Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR



Üye : Doç. Dr. Murat KIZIL (Danışman)



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/09/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince her konuda yardımcı olup ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Murat KIZIL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince göstermiş olduğu özveri ve destek için hocam Doç. Dr. Göksel KIZIL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

DeneySEL çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Bircan ÇEKEN, Sevil EMEN TANRIKUT ve Sevcan ALTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmam için gerekli olan Meryemana dikenli tohumlarının temin edilmesinde yardımcı olan Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman KIZIL'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya laboratuvar imkânı sağlayıp Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Fen Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP 12-FF-20 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu dönemde de bana emek harçayarak destek ve yardımlarını esirgemeyip her zaman yanımda olan çok sevdiğim merhum babam Hüseyin SERÇE ve çok sevdiğim annem Belgin SERÇE'ye, tezin oluşturulma aşamasında büyük emeği geçen ablam Filiz SERÇE'ye, tüm kardeşlerime ve bu süreçte yanımda olan tüm dostlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|----------|
| TEŞEKKÜR | I |
| İÇİNDEKİLER | II |
| ÖZET | V |
| ABSTRACT | VII |
| ÇİZELGE LİSTESİ | VIII |
| ŞEKİL LİSTESİ | IX |
| KISALTMA VE SİMGELER | XII |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 3 |
| 2.1. Reaktif Oksijen Türleri | 4 |
| 2.1.1. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$) | 4 |
| 2.1.2. Nitrik Oksit($\text{NO}\cdot$) | 4 |
| 2.1.3. Peroksil Radikali ($\text{ROO}\cdot$) | 5 |
| 2.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) | 5 |
| 2.1.5. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$) | 5 |
| 2.2. Serbest Radikallerin Etkileri | 6 |
| 2.2.1. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri | 6 |
| 2.2.2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri | 7 |
| 2.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri | 9 |
| 2.3. Antioksidantlar | 9 |
| 2.3.1. Sentetik Antioksidantlar | 11 |
| 2.3.2. Doğal Antioksidantlar | 12 |
| 2.3.2.1. Askorbik Asit (Vitamin C) | 12 |
| 2.3.2.2. Tokoferoller | 13 |
| 2.3.2.3. Flavonoidler | 15 |
| 2.3.2.4. Fenolik Asitler | 17 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.2.5. | Sinnamik Asit | 18 |
| 2.3.2.6. | Karetonoidler | 18 |
| | - Likopen | 19 |
| | - β -Karoten | 19 |
| | - β -Kriptoksantin | 20 |
| | - Lutein | 20 |
| | - Zeaksantin | 20 |
| | -Astaksantin | 21 |
| 2.4. | Önceki Çalışmalar | 21 |
| 3. | MATERYAL ve METOT | 27 |
| 3.1. | Materyal | 27 |
| 3.1.1. | Kullanılan Bitki Türü, Tanımı, Yayılışı ve Kullanım Alanları | 27 |
| 3.1.2. | Kullanılan Kimyasal Maddeler | 28 |
| 3.1.3. | Kullanılan Aletler | 30 |
| 3.2. | Metot | 31 |
| 3.2.1. | Bitki Ekstraktının Hazırlanması | 31 |
| 3.2.2. | Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini | 32 |
| 3.2.3. | Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini | 33 |
| 3.2.4. | DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi | 34 |
| 3.2.5. | İndirgeme Gücü | 35 |
| 3.2.6. | H ₂ O ₂ Söndürme Aktivitesi | 35 |
| 3.2.7. | Protein Oksidasyonu | 36 |
| 3.2.8. | Lipid Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi | 37 |
| 3.2.9. | SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) | 37 |
| 3.2.11. | DNA Agaroz Jel Elektroforezi | 38 |
| 3.2.12. | İstatiksel Analiz | 39 |
| 4. | ARAŞTIRMA BULGULARI | 41 |
| 4.1. | Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini | 41 |
| 4.2. | Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini | 41 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3. | DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi | 42 |
| 4.4. | İndirgeme Gücü | 42 |
| 4.5. | H ₂ O ₂ Söndürme Aktivitesi | 42 |
| 4.6. | Protein Oksidasyonu | 43 |
| 4.7. | Lipid Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi | 43 |
| 4.8. | SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) | 44 |
| 4.9. | DNA Agaroz Jel Elektroforezi | 45 |
| 5. | TARTIŞMA ve SONUÇ | 59 |
| 6. | KAYNAKLAR | 71 |
| | ÖZGEÇMİŞ | 83 |

ÖZET

MERYEMANA DİKENİ (*Silybum marianum* L. Gaertner) TOHUMUNUN ANTIÖKSİDANT AKTİVİTESİ, OKSİDATİF DNA HASARI ve PROTEİN OKSİDASYONU ÖNLEYİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aynur SERÇE

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2012

Meryemana dikenini (*Silybum marianum*), bileşikgiller (*Asteraceae*) familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Meryemana dikenini üzerinde yapılan klinik araştırmalar ve deneyler bu bitkinin içeriğindeki silibin maddesinin kuvvetli bir antioksidan olup sigara, alkol ve kirli hava ile alınmış olan zehirli maddeleri ve oksidatif hasar sonucu üretilen serbest radikalleri etkisiz hale getirdiği, bitkinin içeriğindeki silmarin bileşiklerinin serbest radikallerin zararlı etkilerini önlediği ve genel olarak bitkinin tüm karaciğer fonksiyonlarını desteklediği ve bitki içerisindeki kimyasalların karaciğere ait hastalıkları ve problemleri tedavi edici ve karaciğeri kuvvetlendirici amaçlı kullanılabileceğini ortaya koymuştur

Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümü tarafından yetiştirilen Meryemana dikenini (*Silybum marianum* L. Gaertner) tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktivitesi ve oksidatif DNA hasarı ile protein oksidasyonu önleyici etkisi incelendi.

Çalışmada Meryemana dikenini tohumunun etanol ekstraktının toplam fenolik ve flavanoid bileşen miktarları incelendi. Standart fenolik olarak gallik asit ve standart flavanoid olarak quercetin kullanıldı. Etanol ekstraktının 0.5 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 310 ± 4.93 µg gallik aside eşdeğer ve toplam flavanoid bileşen miktarı 19 ± 0.11 µg quercetine eş değer olarak bulundu.

Meryemana dikenini tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktiviteleri *in vitro* sistemde farklı antioksidant testler kullanılarak araştırıldı. Sıçan karaciğer homojenatında lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine bakıldı ve 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali ile hidrojen peroksit söndürme aktiviteleri ve indirgeme gücü aktiviteleri incelendi.

Meryemana dikenini tohumunun etanol ekstraktının $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ sisteminde lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Meryemana dikenini tohumunun etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi 150 µg/ml konsantrasyonda $\%91.95 \pm 5.20$ olarak bulunurken, indirgeme gücü aktivitesi pozitif kontrol olan BHT ve BHA ile karşılaştırıldığında daha düşük olarak bulundu. Meryemana dikenini tohumunun etanol ekstraktının hidrojen peroksit söndürme aktivitesi 2.5 mg/ml konsantrasyonda $\% 57.1 \pm 0.04$ bulundu. Tohum ekstraktının $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasarı, 1000 µg/ml konsantrasyonda $\%92.92 \pm 3.3$

önlediği belirlendi. Ayrıca ekstraktın DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkisi 1000 µg/ml konsantrasyonda %82.80 olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler : Serbest Radikaller, Meryemana Dikeni (*Silybum marianum* L. Gaertner) tohumu, Antioksidant aktivite, Oksidatif DNA hasarı, Protein oksidasyonu, Lipit peroksidasyonu

ABSTRACT

ANTIOXIDANT ACTIVITY and PROTECTIVE ABILITY OF SEEDS OF MILK THISTLE (*Silybum marianum* L. Gaertner) AGAINST OXIDATIVE DNA DAMAGE and PROTEIN OXIDATION

MSc THESIS

Aynur SERÇE

UNIVERSITY OF DICLE FACULTY OF
SCIENCE, CHEMISTRY
DEPARTMENT

2012

Silybum marianum L. Gaertner is a member of the *Asteraceae* family and its seed extract contains large numbers of chemical constituents including several flavonolignans collectively known as silymarin. Silymarin has powerful antioxidant properties and has a beneficial effect on various hepatic disorders, including hepatotoxicity secondary to acute and chronic viral hepatitis and mushroom poisoning.

In this study, we have evaluated the antioxidant activity and DNA oxidative damage and protein oxidation protection effect of seed of cultivated milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner), harvested from the field (University of Dicle, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Diyarbakır, Turkey).

The ethanol extract of seeds of cultivated milk thistle were prepared and total phenolics and total flavanoids contents were determined. The amount of total phenolic and total flavonoid in ethanol extract seeds (0.5 mg) were found to be 310 ± 4.93 μg GAE/mg extract and 19 ± 0.11 μg QUE/mg extract respectively.

The antioxidant potency of ethanol extract of seeds were investigated employing various established *in vitro* systems, such as lipid peroxidation in rat brain homogenate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydrogen peroxide scavenging activity, reducing power, and inhibitory effect on protein oxidation.

In conclusion, ethanol extract of seeds showed strong inhibitory activity toward lipid peroxidation of rat brain homogenate induced by the $\text{FeCl}_2\text{-H}_2\text{O}_2$ system. The extract was able to reduce the stable free radical DPPH with % 91.95 ± 5.20 at the 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. Reducing power activity of ethanol extract of seeds were found to be lower than BHT and BHA. However H_2O_2 scavenging activity of ethanol extract of *Silybum marianum* seeds were found to be % 57 ± 0.04 at the 2.5 mg/ml concentration. The protect effect of ethanol extract of *Silybum marianum* seeds, on oxidative damage of Bovin serum albumin (BSA) induced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$ /ascorbic acid system were found to be % 92.9 ± 3.3 at he 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. Besides, the protect effect of ethanol extract of seeds on DNA aganist to OH radical generated by $\text{H}_2\text{O}_2\text{-UV}$ photolysis were found to be % 82.80 at 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration.

Key Words: Free radicals, Milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner) seeds, Antioxidant activity, Oxidative DNA damage, Protein oxidation, Lipid peroxidation.

ÇİZELGE LİSTESİ

| <u>Çizelge No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|---------------------|--|--------------|
| Çizelge 2.1. | Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri ve serbest radikal olmayan türler | 4 |
| Çizelge 4.1. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının gallik aside eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarı | 46 |
| Çizelge 4.2. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarı | 47 |
| Çizelge 4.3. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının, BHT ve BHA'nın DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri | 48 |
| Çizelge 4.4. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının ve askorbik asidin H ₂ O ₂ 'i söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri | 50 |
| Çizelge 4.5. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının ve BHT'nin protein oksidasyonunu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri | 51 |
| Çizelge 4.6. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının ve BHT'nin lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri | 52 |
| Çizelge 4.7. | <i>S. marianum</i> tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktı ve yağının H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri | 57 |

ŞEKİL LİSTESİ

| <u>Şekil No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|-----------------|--|--------------|
| Şekil 2.1. | İkincil oksidasyon ürünlerinin oluşumu ve Lipit peroksidasyonunun önerilen mekanizması | 8 |
| Şekil 2.2. | Serbest radikal ile antioksidantlar arasındaki elektron alış verişi | 10 |
| Şekil 2.3. | Sentetik antioksidantların kimyasal yapıları | 11 |
| Şekil 2.4. | Tokoferol ve Tokotrienolün kimyasal yapıları | 13 |
| Şekil 2.5. | α -Tokoferolün kimyasal yapısı | 14 |
| Şekil 2.6. | Flavonoidin kimyasal yapısı | 15 |
| Şekil 2.7. | Flavonoidlerin metal bağlanma bölgeleri | 16 |
| Şekil 2.8. | Benzoik asit ve Sinnamik asidin kimyasal yapıları | 17 |
| Şekil 2.9. | Likopenin kimyasal yapısı | 19 |
| Şekil 2.10. | β -Karotenin kimyasal yapısı | 20 |
| Şekil 2.11. | β -Kriptoksantin kimyasal yapısı | 20 |
| Şekil 2.12. | Luteinin kimyasal yapısı | 20 |
| Şekil 2.13. | Zeaksantin kimyasal yapısı | 21 |
| Şekil 2.14. | Astaksantin kimyasal yapısı | 21 |
| Şekil 3.1. | <i>S. marianum</i> 'un mor türünün bitki, çiçek ve tohum kısımları | 27 |
| Şekil 3.2. | <i>S. marianum</i> 'un tohumları | 28 |
| Şekil 3.3. | Bitki tohumunun etanol ekstraktının hazırlanmasının şematik gösterimi | 31 |
| Şekil 3.4. | Soxhlet düzeneği | 32 |
| Şekil 3.5. | Gallik asit | 33 |
| Şekil 3.6. | Quercetin | 34 |
| Şekil 3.7. | DPPH radikali | 34 |
| Şekil 4.1. | Gallik asidin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri | 46 |
| Şekil 4.2. | Quercetin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri | 47 |
| Şekil 4.3. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi | 48 |

| <u>Şekil No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|-----------------|---|--------------|
| Şekil 4.4. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe ³⁺ ü Fe ²⁺ ye indirgeme gücünün spektrofotometrik analizi | 49 |
| Şekil 4.5. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının H ₂ O ₂ söndürme aktivitesi | 50 |
| Şekil 4.6. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının protein oksidasyonunu önleme aktivitesi | 51 |
| Şekil 4.7. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi | 52 |
| Şekil 4.8A. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi | 53 |
| Şekil 4.8B. | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktının H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu aktivitesinin bant yoğunluğuna karşılık gelen densitometrik analizi | 53 |
| Şekil 4.9A. | Bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT) H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi | 54 |
| Şekil 4.9B. | Bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT) H ₂ O ₂ /Fe ³⁺ /askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu aktivitesinin bant yoğunluğuna karşılık gelen densitometrik analizi | 54 |
| Şekil 4.10A. | <i>S. marianum</i> tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezinin her kuyucuktaki pBluescript M13(+) plazmit DNA'nın Form I ve Form II yüzdeleri | 55 |
| Şekil 4.10B. | <i>S. marianum</i> tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi | 55 |
| Şekil 4.11A. | <i>S. marianum</i> tohum yağının farklı konsantrasyonlardaki petrol eteri ekstraktının supercoiled DNA'yı H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezinin her kuyucuktaki pBluescript M13(+) plazmit DNA'nın Form I ve Form II yüzdeleri | 56 |
| Şekil 4.11B. | <i>S. marianum</i> tohum yağının farklı konsantrasyonlardaki petrol eteri ekstraktının supercoiled DNA'yı H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi | 56 |

| <u>Şekil No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|------------------------|---|---------------------|
| Şekil 4.12. | <i>S. marianum</i> tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktı ve yağının H ₂ O ₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği | 57 |
| Şekil 5.1. | Silmarin bileşenlerinin temel yapısı | 62 |
| Şekil 5.2. | DPPH Radikalinin indirgenmesi | 63 |

KISALTMA VE SİMGELER

| | |
|--------------------|--|
| ROS | : Reaktif oksijen türleri |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| BHA | : Bütillenmiş hidroksi anisol |
| BHT | : Bütillenmiş hidroksi toluen |
| TBHQ | : ter-bütil hidrokinon |
| PG | : Propil gallat |
| BSA | : Bovin Serum Albumin |
| HAT | : Hidrojen Atom Transferi |
| SET | : Tek Elektron Transferi |
| SDS-PAGE | : Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi |
| TBA | : Tiyobarbitürik asit |
| DNPH | : 2,4-dinitrofenil hidrazin |
| TCA | : Trikloroasetik asit |
| EDTA | : Etilendiamintetraasetik asit |
| RNS | : Reaktif azot türleri |
| FCR | : Folin-Ciocalteu indirgeme kapasite analizi |
| <i>S. marianum</i> | : <i>Silybum marianum</i> |

1. GİRİŞ

İnsanlar, çok eski zamanlardan beri çevresindeki bitkilerden gıda, yakacak ve ilaç gibi ihtiyaçlarını karşılamak için faydalanmıştır (Baytop 1984). M.Ö. 3000 yıllarında kullanılmaya başlanan şifalı bitkiler, 1900'lü yıllarda modern tıbbın gelişmesiyle alternatif tıp dalı olarak anılmaya başlanmıştır. Ancak yıllar geçtikçe tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen maddeler üzerindeki çalışmalar bu bitkilere karşı olan ilgiyi arttırmıştır. Böylece yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop 1984). Özellikle son yıllarda kanser gibi çok sayıda kötü hastalığın erken tanısına yönelik birçok çalışma serbest radikaller ve oksidatif stres üzerinde yoğunlaşmıştır (MacNee 2000, Gromadzinska ve ark. 2003)

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Bu radikallerin oluşum hızındaki bir artma ya da ortadan kaldırılma hızındaki bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres; reaktif oksijen türleri (ROS) gibi oldukça reaktif moleküllerin tamamen ortadan kaldırılması veya aşırı oluşması olarak da tanımlanabilir. Singlet oksijen (1O_2), süper oksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikali (RO_2^{\cdot}) ve hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) gibi reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin aşırı üretilmesinin biyolojik makromoleküllerde lipit peroksidasyonu, protein parçalanması ve DNA lezyonları gibi oksidatif hasarlara neden olduğu düşünülmektedir. Hücre içi makromoleküllerde bu oksidatif hasarın birikmesi kanser, inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi belirli dejenere olmuş hastalıklarda ve yaşlanma sürecinde etkili olmaktadır (Kumar ve Chattopadhyay 2007). Antioksidantlar hücrel olarak oksitlenebilen maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddelerdir ve ROS'un üretilmesini önleme veya ROS'u söndürme şekilde aktivite gösterirler (Halliwell ve ark 1992). Sağlığı olumlu yönde etkileyen antioksidantlar antioksidatif koruyucu enzim sistemlerini uyarma, peroksitleri indirgeme, geçiş metallerini şelatlama, serbest radikalleri söndürme ve onlarla doğrudan reaksiyona girme gibi birkaç olası mekanizmayla yararlı etkilerini gösterirler (Zhou ve ark. 2004).

Bitki kökenli bileşiklerin antioksidant aktivitesi yapılarındaki fenolik bileşiklere dayanır (Heim ve ark. 2002). Bitki ekstraktı gibi bitkisel materyallerde bulunan fenolik asit ve flavonoidler gibi çoğu polifenolik bileşik ROS'a karşı antioksidant aktivite gösterirler (Pietta 2000). Fenolik bileşikler bitkiyi oluşturan kısımlara düzenli bir şekilde dağılmamıştır; onlar bitkinin meyve, yaprak ve kabuğunun dış kısımlarında yüksek miktarlarda bulunur (Kahkonen ve ark. 1999)

Son zamanlarda bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), ter-bütül hidrokinon (TBHQ) ve propil galat (PG) gibi sentetik antioksidantların birçok türü gıda, kozmetik ve ilaç oluşumunda oksidasyonu yok edici maddeler veya katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Ancak besinsel ve tıbbi bileşenler için bu sentetik antioksidantların kullanımı insan sağlığında toksik ve karsinojenik etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle sentetik antioksidantların kullanımları sınırlandırılmıştır. Dolayısıyla çoğu araştırmacı son birkaç yıl içinde besinsel ve tıbbi bileşenler için yan etkisiz antioksidant olarak kullanılabilen daha etkili oksidasyon inhibitörlerini bulmaya çalışmaktadır. Bu amaçla sentetik kimyasalların yerini alacak doğal kaynaklardan yüksek aktiviteli ekonomik antioksidantlara yönelik araştırmalar artmıştır (Rajeshwar ve ark. 2005). Son zamanlarda yenilebilir bitkilerde bulunan antioksidant bileşikler gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır çünkü onlar daha az toksik etki gösterebilirken hiçbir toksik etki göstermeyebilirler (Elzaawely ve ark. 2005).

Meryemana dikenli (*Silybum marianum*), bileşikgiller (*Asteraceae*) familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Dünyanın değişik bölgelerinde karaciğer hastalıklarında tedavi amaçlı olarak yararlı fitokimyasallar içeren *Silybum marianum* güvenilir ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Aktay ve ark. 2000). Bu bitki ülkemizde Meryemana dikenli, deve dikenli, alakenger, sütlü kengel gibi isimlerle tanınmaktadır (Gümüşçü ve ark. 1998). Halk arasında toprak üstü kısmı idrar söktürücü, ateş düşürücü, yatıştırıcı, iştah açıcı ve romatizma ağrılarında meyveleri ise, karaciğer hastalıklarında ve safra arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Tanker ve Tanker 1998, Baytop 1999).

Sunulan çalışmanın amacı *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktivitesini incelemek ve bu ekstraktın Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) neden olduğu protein ve DNA hasarını önleme kapasitesini test etmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bir serbest radikal bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip kendiliğinden var olabilen kimyasal türler olarak tanımlanır. Serbest radikaller oldukça kararsız moleküllerdir. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$), alkoksil ($RO\cdot$) ve nitrik oksiti ($NO\cdot$) kapsayan oksijen merkezli serbest radikal örnekleri ve singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorit ($HOCl$) gibi radikal olmayan türler reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir (Çizelge 2.1) (Pietta 2000). ROS'lar ya en az bir çiftleşmemiş elektron içeren radikallerdir ya da biyomolekülleri oksitleme yeteneğine sahip olabilen reaktif radikal olmayan bileşiklerdir. Bu nedenle bu ara ürünler ayrıca oksidant veya pro-oksidant olarak adlandırılır (Halliwell ve Gutteridge 1989, Sies 1991). ROS'lar normal fizyolojik olaylar boyunca sürekli olarak üretilirler ve lipit peroksitlerin birikmesine neden olan membran lipitlerinin peroksidasyonunu kolaylıkla başlatabilirler (Elmastaş ve ark. 2006, Gülçin 2010).

Fizyolojik konsantrasyonlardaki ROS'lar normal hücre fonksiyonları için gerekli olabilir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki ROS'lar hücrel bileşenler tarafından etkili bir şekilde söndürülmezlerse proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücrel biyomoleküllere hasar verici serbest-radikal zincir reaksiyonlarını uyarabilirler ve en sonunda hastalık koşullarına yol açabilirler. Ayrıca mutasyonlara yol açabilen DNA hasarına da neden olabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1990). Oluşan bu hasarlar yaşlanma, kanser, inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıklara neden olur (Aruoma 1994).

ROS'un endojen oluşumu için biyolojik yollar onların üretim yollarıdır. Organizmalar aynı zamanda dış kaynaklardan da ROS'a maruz kalmaktadır. ROS'un eksojen kaynakları tütün dumanını, belirli kirleticileri, organik çözücülerini ve pestisitleri kapsar (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri ve serbest radikal olmayan türler

| Reaktif oksijen türleri | | Serbest radikal olmayan türler | |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|-----------|
| Süperoksit radikali | $O_2^{\cdot-}$ | Hidrojen peroksit | H_2O_2 |
| Hidroksil radikali | $\cdot OH$ | Singlet oksijen | 1O_2 |
| Hidroperoksil radikali | $HOO\cdot$ | Ozon | O_3 |
| Lipit radikali | $L\cdot$ | Lipit hidroperoksit | LOOH |
| Lipit peroksil radikali | $LOO\cdot$ | Hipoklorit | HOCl |
| Peroksil radikali | $ROO\cdot$ | Proksinitrit | ONOO $^-$ |
| Lipid alkoksil radikali | $LO\cdot$ | Dizot trioksit | N_2O_3 |
| Azot dioksit | $NO_2\cdot$ | Nitröz asit | HNO_2 |
| Nitrik oksit | $NO\cdot$ | Nitril klorür | NO_2Cl |
| Nitrozil katyonu | NO^+ | Nitroksil anyonu | NO^- |
| Thiyl radikali | $RS\cdot$ | Peroksinitröz asit | ONOOH |
| Protein radikali | $P\cdot$ | Nitröz oksit | N_2O |

2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

2.1.1. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

Hidroksil iyonunun (OH^-) nötral formudur. Bu radikal yaklaşık tahmin edilen 10^{-9} sn yarılanma süresiyle en reaktif tür olarak bilinir. Hidroksil radikali, metal-katalizli süreçte yer alan endojen H_2O_2 'den veya vucüt sıvısının hemolitik bölünmesiyle yüksek enerjili radyasyon üzerinden *in vivo* olarak oluşabilir. UV ışığı bölünmüş suda enerjik olarak yetersizdir; fakat hidroksil radikalının iki molekülünü üretmede H_2O_2 'i ayırabilir. Bu radikalın yüksek reaktivitesi üretildiği yerde hemen bir reaksiyonu beraberinde getirmesiyle gözlenir (Diplock ve ark. 1998).

2.1.2. Nitrik Oksit ($NO\cdot$)

Nitrik oksit memelilerde önemli bir sinyal molekülüdür. Bu önemli hücrel haberci molekül çoğu fizyolojik ve patolojik süreçlere karışır (Hou ve ark. 1999). Nitrik oksit radikali ($NO\cdot$) arjininden enzimatik olarak oluşturulan sinyal bileşiğidir ve kan-damar duvarlarındaki düz kasları düşürülmüş kan basıncı sonucu gevşetir. Nitrik oksit aynı zamanda primer bağışıklık savunma sistemine katkıda bulunan aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilir. Nitrik oksit radikalının ($NO\cdot$) aşırısı sitotoksiktir. Nitrik oksit radikali, peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmak için biyomoleküllerle doğrudan veya $O_2^{\cdot-}$ ile birleşerek reaksiyona girebilir. Peroksinitrit lipoproteinlerdeki lipit peroksidasyonunu başlatma yeteneğine sahiptir; fakat aynı zamanda proteinlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlamayla hücrel sinyalleşmeye müdahale edebilir (Beckman 1996, Packer 1996).

2.1.3. Peroksil Radikali (ROO·)

Biyolojik sistemlerde önemli ölçüdeki bir difüzyon yoluyla nispeten uzun süreli bulunur. Peroksil radikali çoklu doymamış yağ asitlerinden bir H atomunun çıkarılmasıyla başlatılan lipit peroksidasyonu sürecinden elde edilebilir. Hidroksil radikali bu reaksiyon dizisini başlatma yeteneğine sahiptir. (Esterbauer ve ark. 1992, Reaven ve Witztum 1996). Lipit peroksidasyonu ile üretilen ilave ürünler alkoksi radikalleri (RO·) ve organik hidroperoksitlerdir (ROOH). İkincisi aldehitleri elde etmek için ayrılan endoperoksit ara ürünlere yeniden düzenlenebilir. Proteinlerin amin gruplarıyla aldehitlerin reaksiyonu lipoproteinlerin protein kısmının modifikasyonunu kapsayan bir mekanizma olarak bilinir (Diplock ve ark. 1998).

2.1.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, serbest bir radikal olmayan fakat bir yükseltgeme ajanı olan O₂'nin iki elektron indirgenmesiyle oluşturulur. O₂ ve geçiş metal iyonlarının varlığında H₂O₂ fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikali (·OH) üretebilir (Halliwell ve Gutteridge 1989). H₂O₂ oksidatif metabolizmanın bir yan ürünü olarak organizmalarda doğal olarak üretilir. H₂O₂ radikal olmayan reaktif bir türdür ve canlı hücreler arasında kolaylıkla difüze edilebilir. H₂O₂ yarı ömrünü belirleyen bir süreç olan katalaz enzimiyle suya etkili bir şekilde dönüştürülür. H₂O₂'in nükleer faktör kβ ve apoprotein-1 yolları aracılığıyla sinyal iletimini düzenleyen gen sistemine dahil olmaktadır (Schreck ve Baeuerle 1994, Sen ve Packer 1996).

2.1.5. Singlet Oksijen (¹O₂)

Normal triplet oksijenden daha az kararlı olan moleküler oksijenin (O₂) diamagnetik formu için kullanılan yaygın bir isimdir. Singlet oksijen ışığa maruz kalan dokuda *in vivo* olarak oluştuğu ileri sürülmüş olan radikal olmayan başka bir ROS'dur. Yarılma süresinin onu çevreleyen matriks doğasına bağlı olarak 10⁻⁶ olduğu tahmin edilir. Singlet oksijen kimyasal reaksiyonlarla veya sinyal enerjisini iletmeye diğer moleküllerle etkileşime girebilir. Kimyasal reaksiyonlar için tercih edilen hedefleri DNA bazlarındaki guanin ve çoklu doymamış yağ asitlerindeki çift bağlardır (Stahl ve Sies 1993).

2.2 Serbest Radikallerin Etkileri

2.2.1. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron taşıma olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROS oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir (Cooke ve ark. 2003, Evans ve Cooke 2004).

Kararlı bir molekül olan DNA da lipitler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (Halliwell ve Gutteridge 1999). ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve DNA onarım mekanizmalarının defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır (Cooke ve ark. 2003, Evans ve Cooke 2004).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift sarmal kırıkları, baz modifikasyonları (baz katılımı veya bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir (Cooke ve ark. 2003, Evans ve Cooke 2004).

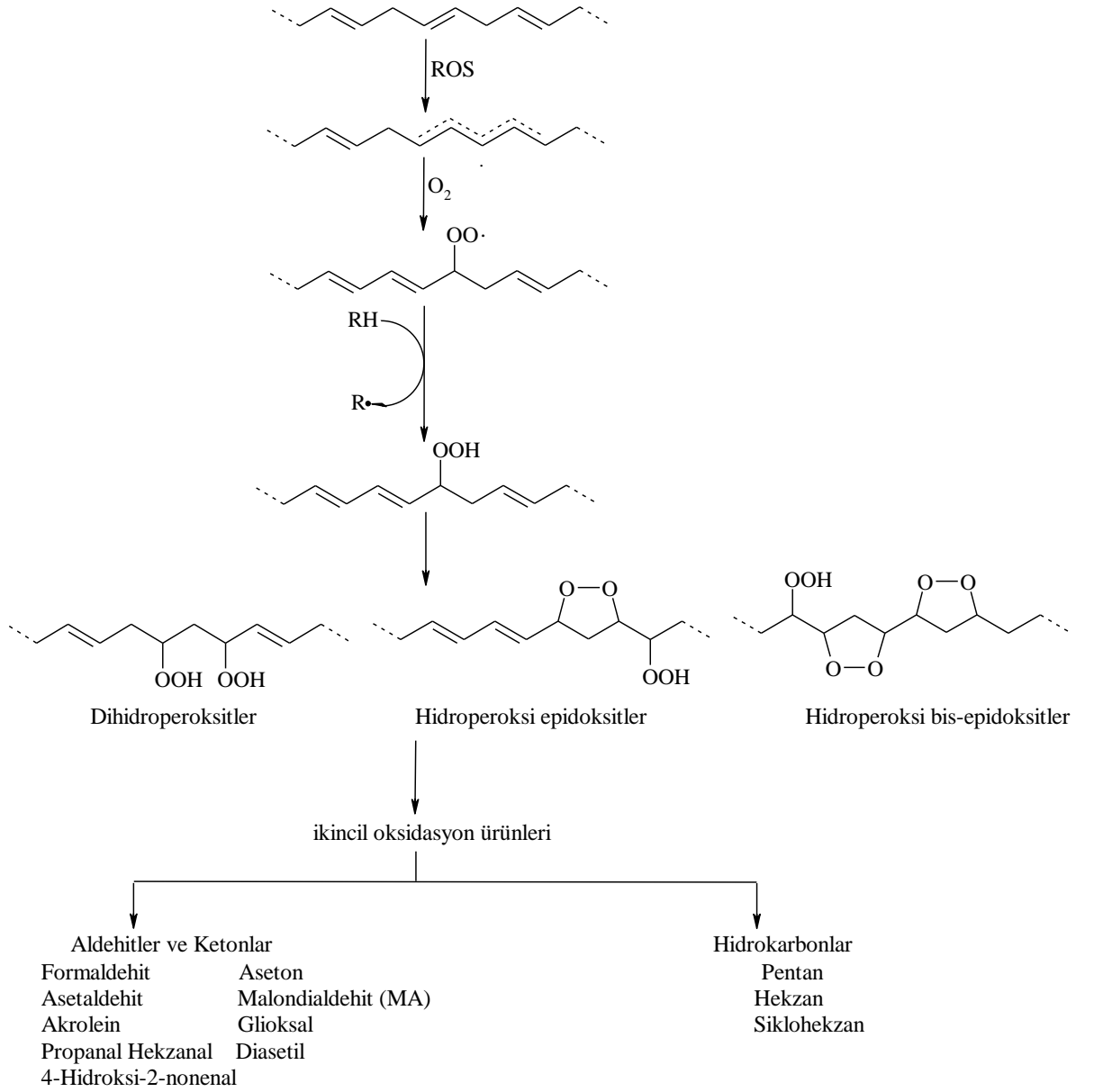
DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{+2/+3}$ ve $Cu^{+1/+2}$ iyonları negatif yüklü DNA'da sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif geçiş metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999). DNA'ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 'in DNA üzerinde reaksiyona girmesinden oluşan hidroksil radikalleri ($\cdot OH$), hidroksil radikal söndürücüleri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, hidroksil radikal söndürücüleri oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (Milligan ve Ward 1994). Bu tür DNA hasarlanmaları, DNA'nın çoğaltılmasının engellenmesine neden olabildiği gibi çok çeşitli mutasyonlarla yanlış ürün ya da hiç ürün üretmemeye de neden olabilmektedir. DNA'nın bu şekilde kararlılığının bozulması hücre ölüm programının aktivasyonuna neden olmaktadır.

2.2.2. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri (Lipit Peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarını aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin büyük bir kısmı serbest radikaller tarafından etkilenir fakat lipitler en hassas olanıdır. Lipit molekülleri hücre membranını ve çeşitli hücreyel organel membranlarını oluşturmaktadır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dienleri ve daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikali meydana gelir. Lipit peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek zincir reaksiyonları şeklinde devam eder (Şekil 2.1.) (Braugher ve ark. 1987, Burton 1989).

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur özellikle hücre içi ve hücreler arası molekül trafiğini ciddi şekilde bozmaktadır. Hücre membranının oksidasyonu lipit radikalinin hidrofobik karakterinden dolayı doğrudan hücre geçirgenliğini etkilemektedir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bunun sonucu deformasyon, iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi farklı şekillerde membran özelliklerini değiştirir.



Şekil 2.1. İkincil oksidasyon ürünlerinin oluşumu ve Lipit peroksidasyonunun önerilen mekanizması

2.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri (Protein Oksidasyonu)

Proteinler oksidatif hasarın majör hedefleri olarak tanımlanmaktadır. ROS ile proteinin ana yapısının reaksiyonu, amino asidin α -karbonundan bir H atomunun hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) bağlanarak ayrılması ve H_2O oluşturması ile başlar (Stadtman ve Levine 2003). H atomunun hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) bağlanarak ayrılması karbon merkezli radikalın oluşumuna neden olur. Karbon merkezli radikal karbon-karbon çapraz bağlı türevleri üretmek üzere bir başka karbon merkezli radikal ile reaksiyona girebilir.

Proteinlerin serbest radikaller tarafından hasarlanması, proteinin fonksiyonunun bozulmasına, eğer bir enzim ise enzimatik aktivitesinin azalmasına, eğer yapısal bir protein ise yapısal görevini yerine getirmemesine neden olmaktadır. Fonksiyonu ve yapısı bozulan proteinler hücrel yıkım sistemleri tarafından yıkılmaktadır. Fakat burada bir denge söz konusudur. Yeteri kadar hızlı yıkılamayan proteinler hücre içerisinde ve hücreler arasında birikmeye neden olmaktadır. Birikmeye başlayan proteinler daha fazla proteini kendi bünyesine çekmektedir. Ayrıca ağır metaller ve çok çeşitli artık metabolitler bu birikimlere dahil olmaktadır. Bu durumda hiçbir hücrel artık temizleme mekanizması bu artığı temizleyememekte ve birikim giderek hızlanarak çok çeşitli patolojilere neden olmaktadır. Alzheimer hastalığı böyle bir patolojinin ürünüdür (Dalle-Donne ve ark. 2003).

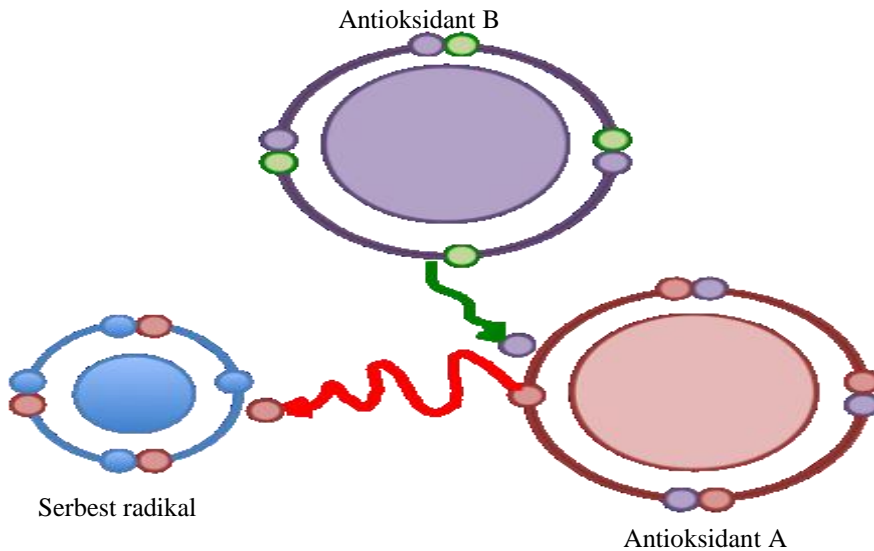
2.3. Antioksidantlar

Normal bir hücrede uygun bir pro-oksidant-antioksidant dengesi vardır. Ayrıca bu denge oksijen türlerinin üretiminde büyük bir artış olduğu zaman veya antioksidantların seviyeleri azaldığı zaman pro-oksidantlara doğru kayabilir. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Sies (1997) oksidatif stres kavramını pro-oksidant-antioksidant dengenin bozulması olarak tanımlamıştır. Başka bir tanıma göre, oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin oluşması ve üretilmesi arasındaki dengesizliği temsil eder ve meydana gelen hasarı tamir etme veya reaktif ara ürünleri kolaylıkla arındırma biyolojik sistemin kapasitesiyle ilgilidir.

Bir antioksidant diğer moleküllerin oksidasyonunu önleme yeteneğine sahip bir moleküldür. Gıda açısından bir antioksidant düşük konsantrasyonlarda oksitlenebilir bir substratı önemli ölçüde geciktiren veya bu substratın oksidasyonunu önleyen herhangi

bir madde olarak tanımlanır (Halliwell ve Gutteridge 1989, Sies 1993, Halliwell 1995). Şekil 2.2’de gösterildiği gibi antioksidant bileşikler serbest radikalleri söndürebilir ve gıda ve farmasötik ürünlerin işleme ve depolama süreci boyunca bozunmasına neden olan lipid peroksidasyonu sürecini geciktirerek raf ömrünü uzatırlar (Halliwell 1997). Antioksidantlar ayrıca ROS’un etkilerinden ve serbest radikallerden insan vücudunu korurlar. Son yıllarda özellikle bitki kökenli doğal antioksidantlar için araştırma yapmaya ve besinsel antioksidantların alternatif doğal ve güvenli kaynaklarını belirlemeye yönelik büyük bir ilgi vardır. Gıda bileşenlerinin antioksidant yeteneğinin belirlenmesi için antioksidant aktivite ve antioksidant kapasite terimleri sıklıkla birbirinin yerine kullanılabilir, ancak onların farklı anlamlara sahip olduğu kabul edilmelidir. Aktivite spesifik bir antioksidant ve spesifik bir oksidant arasındaki bir reaksiyonun sabit bir oranını ifade eder. Kapasite verilen serbest radikalın bir örnek tarafından söndürülme miktarının ölçüsüdür (MacDonald-Wicks ve ark. 2006).

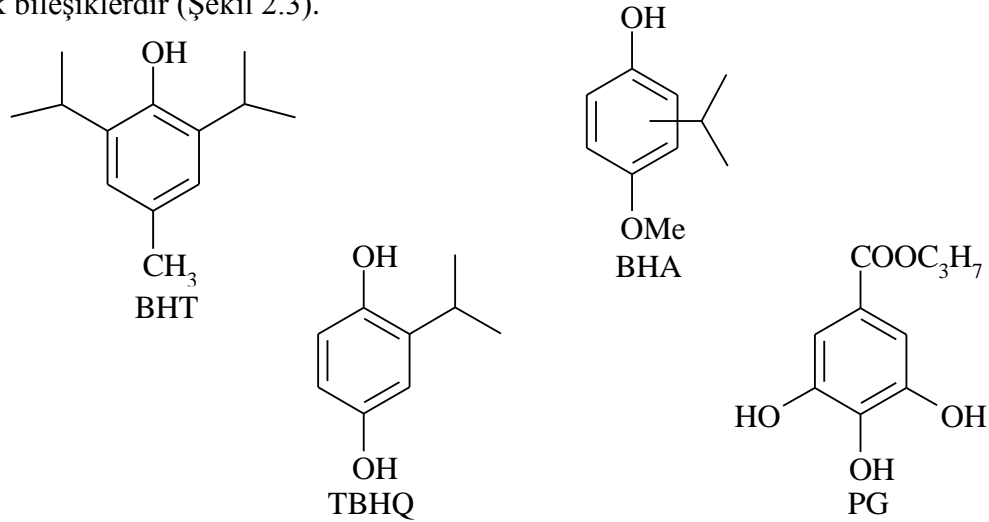
Epidemiyolojik çalışmalar meyve ve sebze alımının onların antioksidant aktivitesine bağlı olarak koroner kalp hastalığı ve kanser gibi yaşa bağlı hastalıkların neden olduğu ölüm oranı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (Eberhardt ve ark. 2000, Ganesan ve ark. 2011). Bu doğal kaynakların en önemli biyoaktif bileşikleri sağlığa olumlu yönde katkıda bulunan fenolikler ve flavonoidlerdir (Bocco ve ark. 1998).



Şekil 2.2. Serbest radikal ile antioksidantlar arasındaki elektron alış-verişi. Bir serbest radikal reaktif bir türdür. Çünkü çiftleşmemiş bir elektrona sahiptir. Serbest radikalın reaktivitesi bir elektron veren antioksidant A tarafından azaltılır ve reaktif bir türe dönüşen antioksidant A ikinci bir antioksidant B tarafından tekrar eski haline dönüştürülür.

2.3.1. Sentetik Antioksidantlar

Kullanılan en popüler sentetik antioksidantlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), ter-bütilhidrokinon (TBHQ) ve propilgallat (PG) gibi fenolik bileşiklerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sentetik antioksidantların kimyasal yapıları

Sentetik antioksidantlar farmakolojik uygulamalarda ve gıdalarda çok yaygın olarak kullanılır. Sentetik antioksidantlar katı ve sıvı yağlardaki çözünürlüklerini arttırmak için daima alkillere süstitüe olurlar (Hudson 1990). Ancak, BHA ve BHT'nin toksik ve karsinojenik etkilerinden şüphelenildiğinden yasal olarak kullanımı sınırlandırılmıştır (Wichi 1988, Sherwin 1990). Bu nedenle besinsel uygulamaları için doğal ve daha güvenli antioksidantlara artan bir eğilim ve doğal antioksidantlara yönelik tüketici tercihlerinde büyüyen bir ilgi vardır. Böylece antioksidantların doğal kaynaklarını keşfetmeye yönelik girişimlere ivme kazandırılmıştır (Gülçin 2006b, 2007).

Bitkisel yağlar için en uygun antioksidant TBHQ'dur. BHA ve BHT ısıya karşı oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle BHA ve BHT pişmiş ve kızarmış ürünlerdeki yağların kararlığında sıklıkla kullanılır. Propil galat gibi galatların dezavantajları ısıya duyarlılıklarından ve karanlıkta demir iyonu ile katılma ürünü verme eğilimlerinden kaynaklanır.

Bu bağlamda doğal ürünler sentetik antioksidantlardan daha sağlıklı ve daha güvenli olarak görülür (Valenzuela ve Nieto 1996). Yaklaşık 1980'den beri doğal antioksidantlar sentetik antioksidantlara bir alternatif olarak görülmüştür.

2.3.2. Doğal Antioksidantlar

İnsan besini sahip olduğu antioksidant aktivitelerin veya onların yapısal özelliklerine göre ROS söndürmede ileri sürülen farklı bileşiklerin bir dizisini içerir. Besinsel antioksidantların en önemli temsilcileri vitamin C, tokoferoller , karotenoidler ve flavonoidlerdir. Vitamin C'nin dışında bu antioksidantların her bir grubu çok sayıda yapısal olarak farklı bileşikler içerir. Örneğin; 600'den fazla farklı karotenoidler zamanla tespit edilmiştir ve onların yaklaşık %50'si insan besininde meydana gelebilir (Sies ve Stahl 1995, Rice-Evans ve Miller 1996, Rock ve ark.1996).

2.3.2.1. Askorbik Asit (Vitamin C)

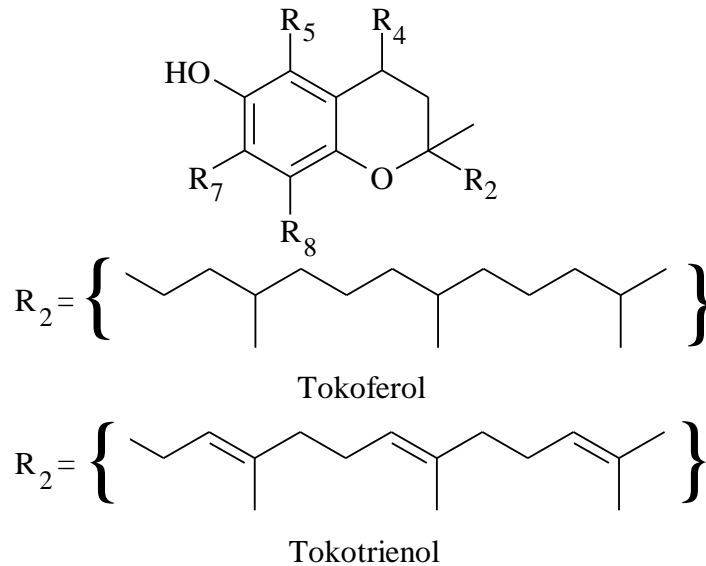
Askorbik asit en güçlü doğal antioksidantlardan biri olarak düşünülebilir ve en az toksik olan doğal antioksidanttır (Bendich ve ark. 1986, Weber ve ark. 1996). Askorbik asit suda çözünebilir bir vitamindir ve çoğu besinsel gıda veya bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Genellikle oksidantlarla reaksiyona girer. Askorbik asit elektron transferiyle radikalik zincir reaksiyonlarını sonlandırabilir. Askorbik asit özeldir. Çünkü bir tek elektron transfer edebilir. Askorbik asit etkili bir indirgendir. Askorbik asit konjuge sistem oluşturan bağ yapmamış hidroksil grubu, karbonil çift bağı ve çift bağdaki elektronların olduğu vinillog karboksilik asit olarak davranır. Askorbik asidin protonlanmamış konjuge bazı iki temel rezonans yapısıyla stabilize edildiğinden askorbik asitteki hidroksil grubu tipik hidroksil grubundan çok daha asidiktir. Diğer bir deyişle, protonlanmamış formun olduğu bir enol olarak düşünülebilen askorbik asit enolatla stabilize edilebilir. Aynı zamanda insan plazması yaklaşık 60 µmol askorbat içerir. ROS'la etkileşiminde askorbik asit, ara ürün askorbil serbest radikali yoluyla dehidro-askorbata yükseltgenir. Dehidroaskorbat, dehidroaskorbat redüktaz enzimiyle askorbik asite geri dönüştürülür. Böylece dehidroaskorbat, askorbatla karşılaştırıldığında yalnızca çok düşük seviyelerde bulunur.

ROS'un bir söndürücüsü olarak, askorbik asit süperoksit radikal anyonu, H₂O₂ hidroksil radikali ve singlet oksijene karşı etkili olarak gösterilmektedir. Sulu çözeltilerde, askorbik asit ayrıca reaktif nitrojen oksit türlerini etkili bir şekilde söndürür. Besindeki askorbik asidin temel kaynakları özellikle narenciye, kivi, kiraz, karpuz gibi meyveler ve domates, yeşil yapraklar, brokoli, karnabahar ve lahana gibi sebzelerdir.

Askorbat ayrıca *in vivo* bir pro-oksidan olarak davranabilir. Serbest geçiş metal iyonları ve askorbatın varlığında, hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) üretilebilir ve lipit peroksidasyonunun başlaması meydana gelebilir. Serbest geçiş metallerinin miktarları *in vivo* olarak çok azdır. Çünkü onlar proteinlere de etkili bir şekilde bağlanır.

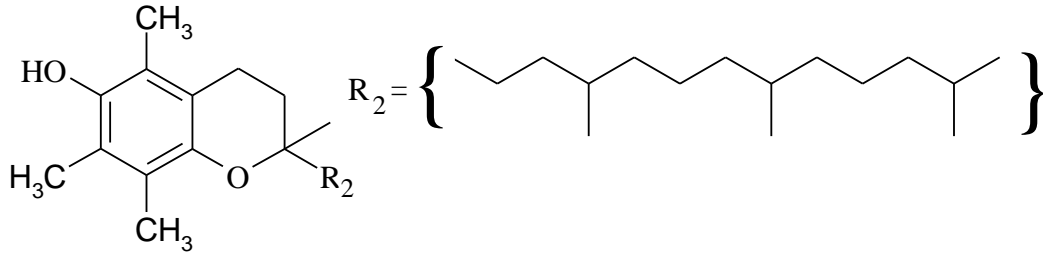
2.3.2.2. Tokoferoller

Tokoferoller E vitamini aktivitesine sahip olan çoğu kimyasal bileşiğin bir sınıfıdır (Gülçin ve ark. 2005a, ArasHisar ve ark. 2004). Tokoferoller iyi bilinen ve en yaygın olarak kullanılan antioksidantlardır (Pokorny 1987). Tokoferoller ve tokotrienoller olarak sınıflandırılırlar ve bu iki sınıfın her birinin içerisinde sekiz tokoferol izomerinin toplamını oluşturan dört izomer (α , β , γ ve δ) vardır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Tokoferol ve Tokotrienol'ün kimyasal yapıları

Tokoferoller aşağı yukarı tüm gıda materyallerinde en az miktarlarda bulunurlar. Genellikle vitamin E'nin en yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gıda kaynakları tüm tahıl tohumları ve kabuklu yemişlerle birlikte sebze yağlarıdır. Bu grubun en önemli antioksidantı diğer tokoferollerden yenilebilir yağlarda (sofra yağı) daha düşük antioksidant aktiviteye sahip olan şekil 2.5'de gösterilen α -tokoferoldür. α -Tokoferol yağda çözülebilir bir antioksidanttır. Lipit peroksidasyonunu azaltmanın yanında α -tokoferol hücre içi etkilerde kullanılabilir. α -Tokoferol hücre organelleri ve hücrenin dış membranında bulunan yağda çözünebilir bir vitamindir. α -Tokoferol zincir kırıcıdır ve aşırı olan oksidasyondan membranları korur (Godbout ve ark. 2004).



Şekil 2.5. α -Tokoferol'ün kimyasal yapısı

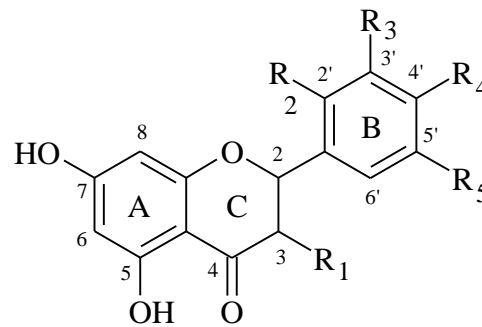
α -Tokoferol bileşiği gıda ürünlerine eklenebilen tokoferolün yaygın bir formudur. Tokoferoller lipit peroksil radikaline hidroksil grubunun hidrojenini vererek antioksidant olarak davranır. Bir tokoferolden oluşan radikal aromatik halka yapısı üzerindeki tek elektronun dekalizasyonu yoluyla stabilize edilir. Bileşiklerin bu grubu oldukça lipofiliktir ve lipoprotein veya membranlarda aktiftir. Onların en önemli antioksidant fonksiyonu bir tokoperoksil radikalini ve lipit hidroperoksidadla üretilen lipit peroksil radikallerini söndürmeyle, lipit peroksidasyonunu önlemede görülür (Diplock ve ark. 1998). Bu radikal tokokinonlara ve tokoferol dimerlere indirgenebilen kararlı peroksidazları içeren radikal olmayan ürünleri oluşturur. α -Tokoferol hidroperoksidadların ayrışmasını geciktirmeyle ilişkilendirilir (Frankel 1996, Etminan ve ark. 2005).

α -Tokoferol Parkinson hastalığına karşı koruyucu etkiye sahiptir. Tokoferollerin eksikliği spinoserebeller ataksi ve miyopatiler gibi nörolojik problemlere neden olur. (Brigelius-Flohé ve Traber 1999). Katı yağlar, sıvı yağlar ve lipoproteinlerdeki tokoferollerin hidrojen verme gücü $\delta > \beta > \alpha$ sıralamasında olur (Timmermann 1990). Katı triaçilgliserollerdeki α -tokoferolün antioksidant gücünün γ -tokoferolünkinden çok daha az olduğu bulunmuştur (Lampi ve Piironen 1998).

Doğal antioksidantlar hemen hemen tüm bitkiler, mikroorganizmalar, mantarlar ve hatta hayvan dokularında bulunur (Pokorny 1999). Fenolik bileşikler ikincil bitki metabolitleridirler ve bitki kökenli gıda ürünlerini de içeren hemen hemen tüm bitki materyallerinde doğal olarak bulunurlar. Bu bileşiklerin insan ve hayvan besinlerinin ayrılmaz bir parçası olduğu düşünülür (Gülçin 2006b). Doğal antioksidantların büyük çoğunluğu fenolik bileşiklerdir ve doğal antioksidantların en önemli grupları tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir.

2.3.2.3. Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerin yaygın bileşenleridir. 4.000'inin üzerinde flavonoid içeren çeşitli bitki türlerinde tanımlanmış 8.000'den fazla polifenolik, bitkinin yaprak, kök, gövde, meyve ve tohum gibi hemen hemen tüm kısımlarından izole edilmiştir (Harborne ve ark. 1999). Temel flavonoid yapısı A, B ve C ile isimlendirilen üç halkada ($C_6-C_3-C_6$) bulunan on beş (15) karbon atomundan oluşmuş flavon çekirdeğidir. A, B, ve C olarak belirlenen üç halkayı içeren bu bileşiklerin genel yapısı şekil 2.6'de gösterilmiştir. Pironil halka C'deki bir hidroksil grubu, bir karbonil grubu ve bir çift bağın varlığı onların çeşitli alt sınıf ve sınıflar içinde sınıflandırılması için kullanılır. Hidroksil gruplarıyla A ve B halkalarının süstitüyonu her bir sınıfın üyelerini tek tek ayırır (Musialik ve ark. 2009). Flavonoidler doğal olarak meydana gelen bitki fenoliklerinin büyük bir grubunu teşkil eder. $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletiyle karakterize edilirler.

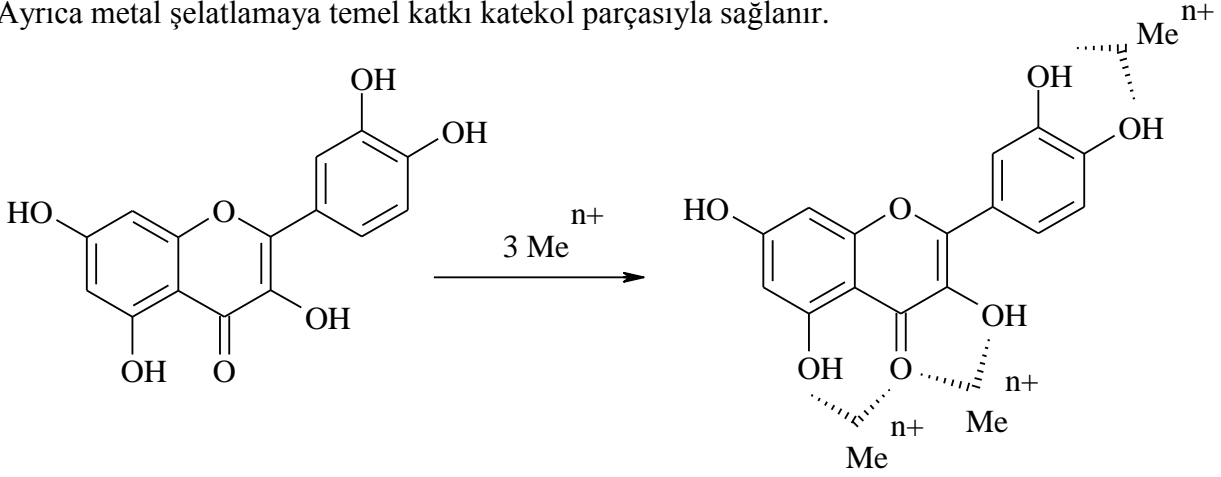


Şekil 2.6. Flavonoidin kimyasal yapısı

Flavonoidler çok etkili antioksidantlardır ve flavonoidlerin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltmayla kardiyovasküler hastalığa karşı koruyucu olduğu önerilir. Ayrıca flavonoidler besinlerimizin temel antioksidant bileşenleridir (Dragsted ve ark. 1997). Flavonoidler genellikle yiyeceklerden zayıf bir şekilde absorbe edilir. Flavonoidlerin en önemli faydaları oksidatif hastalıklara karşı koruması, çeşitli enzimlerin aktivitesini modüle etme yeteneği (Middleton ve Kandaswami 1993) ve spesifik reseptörlerle etkileşimleridir (Williams ve ark. 2004). Genellikle flavonoidlerin etkili antioksidant yeteneği bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar molekül çevresindeki hidroksil ve karbonil grubunun düzenlenmesine sıkı bir şekilde bağlı olan metal-şelatlama potansiyeline, hidrojen veya elektron veren süstitüentlerin varlığında serbest radikalleri azaltabilme yeteneğine ve kararlı bir fenoksi radikalinin oluşumunu önleyen çiftleşmiş elektronu dekalize eden flavonoid yeteneğine bağlıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Flavonoidlerde metaller için önerilen bağlanma bölgeleri B halkasındaki katekol parçası, heterosiklik halkadaki (C halkası) 3-hidroksil, 4-okso grupları ve heterosiklik halka ve A halkası arasındaki 4-okso, 5-hidroksil gruplarıdır (Şekil 2.7) (Pietta 2000). Ayrıca metal şelatlamaya temel katkı katekol parçasıyla sağlanır.



Şekil 2.7. Flavonoidlerin metal bağlama bölgeleri

Flavonoid yarımından üretilen radikalın kararlılığı ortaklanmamış elektron içeren oksijen ve hidroksil arasında oluşan hidrojen bağına dayanır. 4-okso grubuyla konjuge edilmiş karbon ve C halkasındaki C=C çift bağının varlığı çiftleşmemiş elektronun delokalizasyonu için büyük önem taşır. Ayrıca antioksidant aktivite 3 ve 5 pozisyonlarındaki hidroksil grubunun varlığıyla sağlanır. Bir 4-okso gruptaki bir iç hidrojen bağı bu pozisyonlara kinetik olarak eşdeğer haldedir (Bors ve ark. 1990). Ayrıca, fenolik antioksidantların hidrojen atom transferi (HAT) ve proton transferiyle devam edilen tek-elektron transferi (SET-PT) olarak adlandırılan kabul edilmiş iki genel mekanizması vardır (Wright ve ark. 2001). Hidroksil gruplarının var olmasının bir sonucu olarak, çoğu flavonoid biyolojik sistemlerin su fazında çoğunlukla yer alır.

Serbest hidroksil gruplarıyla flavonoidler serbest radikal söndürücü olarak davranır ve çoklu hidroksil gruplarıyla özellikle B halkasındaki gruplarla, flavonoidlerin antioksidant aktivitesi artar. B halkasındaki hidroksiller oksidasyon zincirini önleyen birincil aktif bölgedir (Jovanoic ve ark. 1994).

Flavonoidler antioksidant özelliklere sahiptirler ve koroner kalp hastalığını önleyebilirler (Gülçin ve ark. 2011a, b). Flavonoidlerin biyolojik ve antioksidant aktiviteleri onların kimyasal yapısına bağlıdır. Flavonoidlerin serbest radikal söndürme aktivitesi ve antioksidant aktivitesini belirlemeden sorumlu üç yapısal grup vardır.

Bunlar;

- B halkasının katekol kısmı

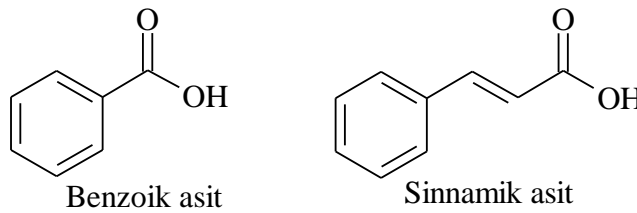
- C halkasındaki 3-hidroksil grubunun varlığında karbonil grubunun 4-okso fonksiyonuyla konjugasyondaki 2, 3-çift bağı ve

- A halkasındaki 3 ve 5 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının varlığı

Quercetin üç yapısal grubun hepsine sahiptir B halkasında 5' pozisyonundaki bir hidroksil grubunun varlığı antioksidant potansiyeli önemli ölçüde artırır.

2.3.2.4. Fenolik asitler

Fenolik asitler üzerine ilginin son odağı koroner kalp hastalığı, felç ve kanser (Gülçin ve ark. 2010a) ve antiglokoma (Çoban ve ark. 2007, Innocenti ve ark. 2010a, b Öztürk Sarıkaya ve ark. 2010, 2011, Şentürk ve ark. 2011) gibi oksidatif hasar hastalıklarına karşı meyve ve sebzelerin yenmesi yoluyla onların potansiyel koruyucu rolünden kaynaklanır. Fenolik asitler bitkilerde serbest ve bağlı formlarının varlığında besinsel fenoliğin yaklaşık %30'unu oluşturur (Robbins 2003). Fenolik asitler, sinnamik asit grubu ve benzoik asit grubundan meydana gelen aromatik karboksilik asitlerin hidroksi türevleridir. Sinnamik asit türevleri benzoik asit türevlerinden daha aktif antioksidantlardır (Cuvelier ve ark. 1992, Marinova and Yanishlieva 1994, Chen ve Ho 1997).



Şekil 2.8. Benzoik asit ve Sinnamik asidin kimyasal yapıları

Fenolik asitlerin ve onların türevlerinin antioksidant aktivitesi aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının yeri ve sayısı, bağlanma bölgesi ve aromatik halkadaki hidroksil gruplarının karşılıklı süstitüentlerin yeri ve türüne bağlıdır (Rice-Evans ve ark. 1996; Sroka ve Cisowski 2003). Şekil 2.8'de gösterildiği gibi fenolik asitlerin hidroksibenzoik asit ve hidrosisinnamik asit olmak üzere iki temel grubu vardır. Hidrosisinnamik asidin hidroksi benzoik asitten önemli ölçüde daha yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Sinnamik asitlerdeki $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ grubunun varlığı benzoik asitteki COOH grubundan daha fazla antioksidant

kapasite sağlar (Cuppett ve ark. 1997). Fenol omurga yapısındaki farklı sübstitüentlerin varlığı onların antioksidant özelliğini özellikle onların hidrojen verme kapasitesini modüle eder. Genellikle sübstitüe edilmemiş fenol hidrojen verici olarak inaktiftir ve monofenol, polifenolden daha az etkili bir antioksidanttır. Orto ve para konumundaki hidroksil grubu gibi elektron verici grubun yer alması fenol ve fenolik asidin antioksidant aktivitesini artırır (Pokorny 1988, Chimi ve ark. 1991). Bir molekülün antioksidant aktivitesi karbonil grubunun aromatik halkadan ayrılmasıyla artar. Sinnamik asit, benzoik asit ile karşılaştırıldığında bir antioksidant olarak daha etkilidir.

2.3.2.5. Sinnamik Asit

Sinnamik asit türevleri biyoaktif bitki ve besin maddeleridir. Onlar *in vivo* olarak sağlığa faydalı etkiye sahip olan *in vitro* antioksidant aktivite gösterirler (Kroon and Williamson 1999). Fenolik asitlerin antioksidant aktivitesi zayıf polar organik ortamda O-H bağ ayrışma entalpi değerlerinin büyüklüğüyle ters orantılıdır. Zincir kırma eyleminin anahtar mekanizması fenolik OH'dan peroksil radikaline hidrojen atomu transferidir (HAT).

Monofenoller, difenol ve polifenollerden daha az etkilidir. Son zamanlarda yapı ve aktivite arasındaki ilişkiyle ilgili bir çalışmada L-dopa'nın L-tirozin'den daha yüksek antioksidant ve radikal söndürme aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Orta ve para pozisyonundaki ikinci bir hidroksi grubunun yer alması antioksidatif aktiviteyi artırır. Monofenollerin etkisizliğinin önlenmesi bir veya iki metoksi sübstitüentin yer almasıyla artırılır.

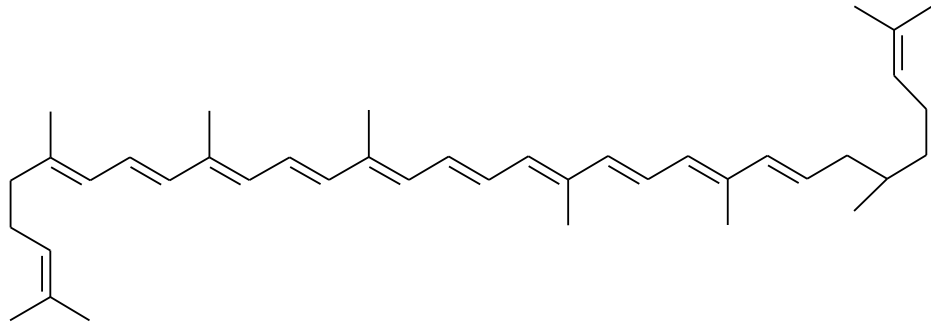
2.3.2.6. Karetonoidler

Antioksidantlar farklı radikal ve oksidant kaynakları için farklı bir yolla yanıt verebilir. Örneğin; karetonoidler özellikle fenolikler ve diğer antioksidantlara nispeten peroksil radikallerinin iyi söndürücüleri değildirler, fakat onlar en iyi diğer fenolikler ve antioksidantların nispeten etkisiz olduğu singlet oksijeni söndürmede olağanüstü bir özelliğe sahiptirler (Prior ve ark. 2005). Karotenoidler, yağda çözünebilen bileşiklerin doğal sınıfıdır. Çoğunlukla bitkilerden sentezlenir ve belirlenmiş antioksidant aktiviteyle doğal renklendiricilerdir (Stahl ve Sies 1993). İnsan gıdasındaki kantitatif en önemli karetonoidler β -karoten, likopen, lutein, β -kriptoksantin, zeaksantin ve astaksantindir (Riccioni 2009). Karetonoidler insan aracılı çalışmalarda belirli yüksek

riskli populasyonlarda bazı zararları ileri sürmeyle birlikte ve çoğunlukla sıfır bulgu, bazı pozitif bulgularla tartışmalı sonuçlar göstermesine rağmen ucuz ve olası bir tedavi olarak hastalıkları önlemede kullanılabilir. Karetonoidler β -karoten, lutein, zeaksantin ve likopen içeren meyve ve sebzelerin renklerinden sorumlu temel pigmentlerdir. Her bir çift bağ, artan daha uzun dalga boylarının görünebilir ışığı absorblayan molekülün daha yüksek enerjili hale geçmesine izin veren elektronlar için gerekli olan enerjiyi düşürür (Ricconi 2009).

Likopen

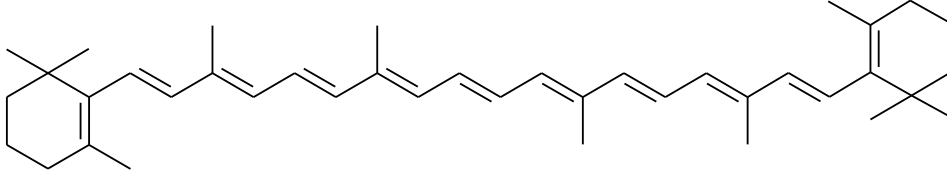
Likopen, karpuz, kavun, pembe greyfurt ve pembe guava gibi diğer kırmızı meyveler ve domateste bulunan karetonoid pigmentidir (Şekil 2.9). Likopen ismi domatesin *Solanum Lycopersicum* sınıflanmış türlerinden elde edilir. Likopen kırmızı görüldüğü için görünür spektrumun çoğunu absorplar. β -karoten, likopen, lutein, β -kriptoksantin, zeaksantin ve astaksantin gibi bazı karetonoid pigmentlerinin kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Likopenin kimyasal yapısı

β -Karoten

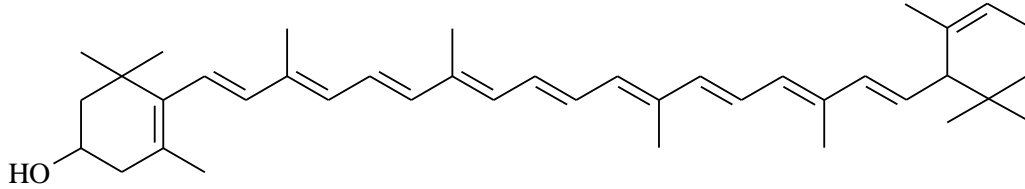
Bitki ve meyvelerde bol olan şiddetli kırmızı-turuncu renklenmiş bir pigmenttir. Organik bir bileşiktir ve kimyasal olarak bir hidrokarbon sınıfındadır. Özellikle onun izopren birimlerinden elde edilmesini yansıtan bir izoprenoid olarak sınıflandırılır. β -karoten 8 izopren biriminden biyokimyasal olarak sentezlenen tetraterpenler olan karotenlerin bir üyesidir ve böylece 40 karbona sahiptir (Şekil 2.10). Karotenlerin bu genel sınıfı arasında, β -karoten molekülün her iki sonundaki beta halkalarına sahip olmasıyla ayırt edilir (Susan ve Arnum 1998).



Şekil 2.10. β -Karotenin kimyasal yapısı

β -Kriptoksantin

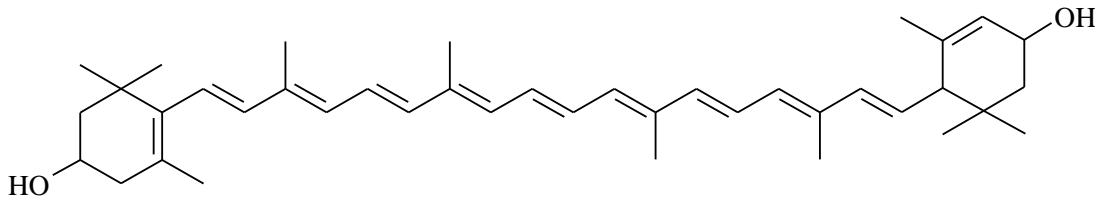
β -kriptoksantin doğal bir karotenoid pigmentidir (Şekil 2.11). β -kriptoksantin bovin kan serumu, elmalar, yağ, yumurta sarısı, kavun, portakal kabuğu ve yer kirazı cinsindeki bitkilerin çiçeklerini ve taç yapraklarını içeren çeşitli kaynaklardan izole edilir. (Lorenzo ve ark. 2008).



Şekil 2.11. β -Kriptoksantin'in kimyasal yapısı

Lutein

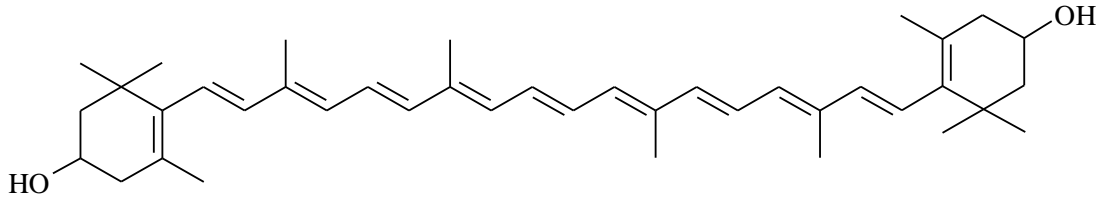
Lutein bir ksantophildir ve en iyi bilinen doğal olarak meydana gelen karotenoidlerden biridir (Şekil 2.12). Lutein ıspanak ve lahana gibi yeşil yapraklı sebzelerde bulunur. Lutein mavi ışığı absorplar ve bir antioksidant olarak organizmalar tarafından kullanılır. Lutein ayrıca yumurta sarısı, hayvansal yağ ve retinada da bulunur (Johnson ve ark. 2000).



Şekil 2.12. Lutein'in kimyasal yapısı

Zeaksantin

Zeaksantin göz retinasının içini kapsayan iki temel ksantophil karotenoidlerinden birisidir (Şekil 2.13). Periferel retinada lutein baskın iken sarı noktanın merkezi içinde zeaksantin baskındır. Adı zeaksantindeki temel sarı pigmenti sağlayan *Zea mays*'dan gelir (Krishnadev ve ark. 2010).

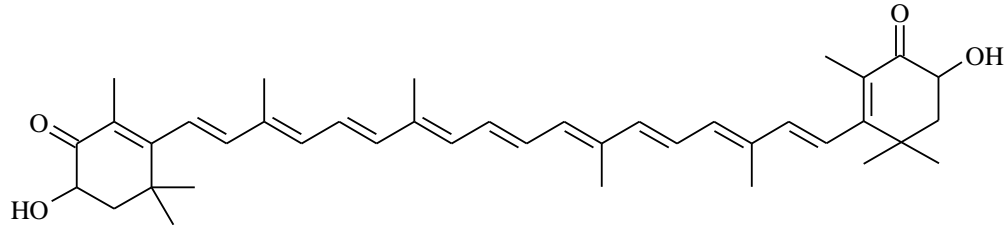


Şekil 2.13. Zeaxantin'in kimyasal yapısı

Astaksantin

Çoğu karotenoid gibi astaksantin de renklidir ve yağda çözünebilen bir pigmenttir (Şekil 2.14). Astaksantin, mikroalg, maya, somon, alabalık, karides benzeri deniz canlısı, karides, kerevit, kabuklular ve bazı kuşların tüylerinde bulunur. Astaksantin pişirilmiş kabukluların ve somon etinin kırmızı rengini sağlar. Astaksantin, bazı karotenoidlerin aksine insan vücudundaki A vitaminine dönüşmez. A vitaminin fazlası da insan için toksiktir, fakat astaksantin toksisitesi daha düşüktür. Astaksantin diğer karotenoidlerden biraz daha düşük bir antioksidant aktiviteye sahip bir antioksidanttır (Mortensen and Skibsted 1997).

Karotenoidler fotooksidatif süreçlere karşı bitkilerde koruyucu bir rol oynar. Örneğin, peroksil radikalleri (Stahl ve Sies 2003) ve singlet moleküler oksijeni (Di Mascio ve ark. 1989) söndürmede etkili antioksidantlardır.



Şekil 2.14. Astaksantin'in kimyasal yapısı

2.4.Önceki Çalışmalar

Miller (1996) Zehirler, ağır metaller, ilaçlar, radyasyon, hormonların fazlası, doymuş ve acılaştırılmış yağlar, biyokimyasal reaksiyonlarda meydana gelen metabolitler, pestisitler, herbisitler, nikotin, stres, proteince zengin diyet gibi faktörler karaciğerin işini zorlaştırır. Yüksek yağ, şeker, protein diyetleri karaciğeri strese sokmaktadır. Bu durumlara maruz kalmak karaciğerdeki glutatyon miktarını azaltır ve dolayısıyla karaciğer hasara karşı hassaslaşır. Miller Silmarin'in karaciğer hücrelerini antioksidan etkisi ile de desteklediğini, detoksifikasyon aşamalarını stimüle ederek etki gösterdiğini bulmuştur. Bu etkisini glutatyon üretimine katkıda bulunarak yaptığını göstermiştir.

Silmarin'in karaciğer hücrelerindeki glutasyon seviyesini %35- 50 oranında arttırdığını deneylerle saptamıştır ve karaciğer detoksifikasyonunda bu mekanizma önemli bir rol oynamaktadır. Miller ayrıca Silmarin'in serbest radikallerin zararlı etkilerini de önlediğini göstermiştir.

Miller (1996) Silibin'in *in vitro* deneylerde böbrek hücrelerindeki oksidatif zararı da azalttığı gözlemiştir. Sıçanlarda silibin'in sisplatinin neden olduğu nefrotoksisiteyi engellediğini ve Silmarin'in antioksidan olarak pankreası da zararlardan koruduğunu gözlemiştir.

Brown (1996) Silmarin'in aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinde bulunan diğer bir antioksidan olan süperoksit dismutazın da etkisini arttırdığını bulmuştur. Silmarin'in insan plateletlerinde lipit peroksidasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etkiler özellikle alkol alanlarda önemlidir. Alkol bağımlılığı immunsupresyon yaptığı için bazı bireylerde önemli hasara neden olabilir. Bu sebepten alkol tüketiliyorsa antioksidan desteği almak gereklidir. Brown Silmarin'in ayrıca eritrosit membranını lipit peroksidasyonuna ve hemolize karşı koruduğunu göstermiştir. Yapılan araştırmalara göre bu bitkinin karoten, selenyum, C ve E vitamininden daha potansiyel bir antioksidant olduğunu ifade etmiştir.

Flora ve ark. (1998) Silmarin'in karaciğerin kimyasal, fonksiyonel ve morfolojik değişimleri üzerindeki etkisini incelemek üzere yaptıkları bir çalışmada, alkolden kaynaklanan nispeten hafif ve subakut karaciğer hastalarına günde 420 mg dozda silimarin verilmiştir. Başlangıçta serum transaminaz seviyesi yüksek iken 4 hafta sonra SGPT ve SGOT seviyelerinde önemli bir azalma görülmüştür. Ayrıca karaciğer hücrelerinde meydana gelen histolojik değişimler de normale dönmüştür, böylece silmarin'in alkol metabolizmasını yavaşlattığı ve karaciğeri potansiyel hasardan koruduğu sonucuna varmışlardır.

Barrite ve ark. (2002) *S. marianum* flavonolignanlarının karaciğere iki spesifik etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. Birincisinin silmarin'in karaciğer hücresi membranına bağlandığını ve böylece karaciğeri çevresel toksinlerin olası zararlarından koruduğunu (örneğin mantar zehiri, endojen zehirler, serbest radikaller) . İkincisinin ise silmarin'in karaciğer hücrelerine girdiğini ve karaciğer sağlığı için hayati olan

enzimlerin yapımını arttırdığını böylece rejenerasyonu stimüle ettiğini gözlemlemişlerdir.

Wang ve ark. (2002) Karaciğer, aktive olmuş lökotrienler gibi zararlı bileşikler nedeniyle hasar görebilir. Bunlar bir oksijen molekülü doymamış yağ asidine transfer olurken meydana gelir. Bu reaksiyonun olması için lipoksijenaz enzimi gerekmektedir. Silmarin'in bu enzimin etkisini inhibe ettiğini, lökotrienlerde de bir azalma olduğunu gözlemişlerdir. 5-Lipoksijenaz baskılanması ile Silmarin'in hidrojenperoksit ve süperoksit nedeniyle olan yaralanmalardan da koruma etkisine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Silmarin'in aynı zamanda reaktif oksijen çeşitlerini (ROS ve R-OH) ve Nükleer faktör-kappa B'yi baskıladığını göstermişler ve bu yolla enflamasyon ve karsinojenez düzenlediğini ifade etmişlerdir. Mikroglia beyin hücrelerinin makrofaj benzeri bir popülasyonudur, merkezi sinir sistemi savunma ve doku tedavisinde rol oynar. Silmarin'in efektif olarak lipopolisakkarit nedenli süperoksit üretimi ve nükleer faktör kappa B aktivasyonunu engellediğini, merkezi sinir sisteminde nörodejeneratif hastalığın ilk basamaklarında gelişen mikroglia aktivasyonu denenen antiinflamatuvar cevabı inhibe ettiğini, dolayısıyla Nükleer Faktör aktivasyonunun inhibisyonuna aracılık ettiğini bulmuşlardır ve LPS-indüklü nörotoksisiteden dopaminerjik nöronları koruduğunu göstermişlerdir.

Fraschini ve ark. (2002) *S. marianum* infüzyonunun farelerde karaciğer enzim fonksiyonları üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuçta hayvan dokularında glutatyonun arttığını, sitokrom P450 ve transaminazların azaldığını gözlemişlerdir, bunun da bitkinin hepatoprotektif etkisinden ileri geldiğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca aşırı demir alımında şelat oluşturarak glutatyon parçalanmasını azaltıcı etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Yaptıkları bir çalışmada glutatyonun %35 oranında arttığını göstermişlerdir.

Gunaratne ve Zhang (2003) ile Dehmlow ve ark.(1996) Silibin'in antioksidan etkisini, Kupffer hücreleri tarafından nitrik oksit ve süperoksit anyon radikallerinin üretimini azaltarak gösterdiğini ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra Silibin'in kupffer hücrelerinin ürettiği lökotrien oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Silimarin'in karaciğer, bağırsak ve mide tarafından salgılanan glutatyon üretimini arttırdığını bulmuşlardır. Glutatyon karaciğerdeki detoksifikasyon hücrelerince hormon, kimyasal

madde ve ilaçların metabolizmasında kullanılır. Silibin'in ise aşırı demir yüklenmesi ile oluşan hepatit ve mitokondrial glutatyonun oksidasyonunu azalttığını, ayrıca fosfotidilkolin sentezini stimüle edip kolinfosfotidiltransferaz aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Süperoksit anyon radikal ve nitrik oksit yapımını doz bağımlı olarak inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Singh ve Agarwal (2005) Yaptıkları bir çalışmada UV radyasyonunun deri hücrelerinde oksidatif stresi arttırdığını, reaktif oksijen çeşitleri (ROS) oluşturduğunu ve bunun da kanserin başlamasına neden olduğunu göstermişlerdir. ROS oluşum yollarını antioksidanların engelleyebildiğini ileri sürmüşlerdir. Yüksek kanser riskinde ve ileri güneş yanığında silimarin'in antioksidant olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Victorrajmohan ve ark. (2005) Yaptıkları bir çalışmada yetişkinlerde kronik karaciğer hastalığında Legalon® preparatı 560 mg/gün dozda verilmiş aspartat transferaz, alanin transferaz, l-glutamilttransferaz enzimlerinin sırasıyla % 36; 34; 46 oranında düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Ahmed ve ark. (2006) *Silybum marianum* triterpenoitlerinin konsantrasyona bağlı olarak kemotripsini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Hoh ve ark. (2006) Silibin'in oral alımı hakkındaki yaptıkları bir pilot çalışmada kemirgenlerde kolorektal kanseri önleyici etkisini bulmuşlardır. Bu etkisinin, intestinal kanserde kuvvetli bir antioksidan olduğu sonucuna varmışlardır.

Li ve ark. (2006) Silibin'in UV nedenli insan keratinosit hücrelerinde kaspase 8 yolları yoluyla apoptozisi inhibe ettiğini, incelenen bu etkinin uygulamadan 9 saat sonra görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Nencini ve ark. (2006) Silmarin'in sıçan beyinde oksidatif hasardan koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Yüksek dozda oral yolla asetaminofen alımı glutatyon değerinde azalmaya neden olur. Sıçanda asetaminofen nedenli beyin hasarında enzimatik-nonenzimatik antioksidan savunma sistemi araştırılmıştır. Albino Wistar sıçanlarına önce asetaminofen verilmiş, glutatyon; askorbik asit miktarı ve süperoksit dismutaz aktivitesinin azaldığı, okside olmuş glutatyon ve malondialdehit seviyesinin ise arttığı gözlenmiştir. Silmarin uygulanmış sıçanlarda glutatyon, askorbik

asit miktarının ve süperoksit dismutaz aktivitesinin önemli ölçüde artmış olduğunu bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Silybum marianum* L. Gaertner (Meryemana dikenini) bitkisinin tohumu Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman KIZIL tarafından kültürü yapılarak elde edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Bitkinin Botanik Özelliği, Yayılışı ve Kullanım Alanları

Silybum marianum L. Gaertner (Meryemana dikenini) *Asteraceae* familyasına bağlı bir bitki olup ülkemizde özellikle Batı ve Güney Anadolu'da İzmir, Aydın, Denizli, Mersin, Adana ve Antakya yörelerinde ve Marmara bölgesinin sahil kesiminde; yol ve tarla kenarları ile boş alanlarda yetişmektedir. Bu bitki ülkemizde Meryemana dikenini, deve dikenini, alakenger, sütlü kengel gibi isimlerle tanınmaktadır (Gümüşçü ve ark. 1998).



Şekil 3.1. *S. marianum*'un mor türünün bitki, çiçek ve tohum kısımları

Silybum marianum gövdesi köşeli, seyrek tüylü, 1-2 yıllık 40-150 cm'e kadar uzanan otsu bir bitkidir. Bitkiler hayat döngülerini erken filizlenip yeterince büyürlerse bir yılda tamamlar. Filizlenme sonbahar ve ilkbaharda meydana gelir. Kuraklığa dayanıklıdır, güneşli yerleri ve taşlı toprağı sever. Yaprakları kesik ve yuvarlaktır, 20 cm uzunluğa ve 10 cm genişliğe ulaşabilir. Genç yaprakları ise daha küçük ve az lobludur. Sapı sert ve siyahtır. Çiçekleri; baş şeklinde olup bir arada toplu görünümündedir, 2-6 cm'e kadar büyüyebilirler. Çiçekler parlak kırmızı-pembe veya eflatun-kahverengidir, borumsu ve yoğun dikenlidir. Her bir çiçek yaklaşık 190 tohum taşır. Tohumu ise; koyu renkli oval farklı yüzeylerden oluşmuştur ve 6 mm

uzunluğundadır. Tohumlar 9 yıl süreyle kullanılabilir. Çoğalma da tohumlar yoluyla olur. Meyveleri 7 mm uzunlukta, esmer-siyah renkli, parlak, lekeli (Tanker ve ark. 2004). Türkiye’de kültürü yapılmaktadır, iki alt türü bulunmaktadır, *S. marianum* ssp. *marianum* ve *S. marianum* ssp. *anatolicum*’dur. Özellikle Akdeniz çevresindeki ülkelerde uzun yıllardır karaciğer için tonik olarak kullanılmaktadır. Bitkinin tüm kısımları yiyecek olarak kullanılabilir, çünkü toksik değildir. Halk arasında toprak üstü kısmı idrar söktürücü, ateş düşürücü, yatıştırıcı, iştah açıcı ve romatizma ağrılarında meyveleri ise, karaciğer hastalıklarında ve safra arttırıcı olarak kullanılmaktadır (Tanker ve Tanker 1998, Baytop 1999).



Şekil 3.2. Meryem ana diken tohumları

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| Malzeme | Marka |
|---|-------|
| 1. Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) | Sigma |
| 2. 1, 1- difenil-2-pikril hidrazin (DPPH) | Sigma |
| 3. Gallik Asit (3, 4, 5- trihidroksibenzoik asit) | Sigma |
| 4. Deoksiriboz | Sigma |
| 5. Agaroz | Sigma |
| 6. Bovin Serum Albumin | Sigma |

| Malzeme | Marka |
|---|--------------|
| 7. Glasiyel asetik asit | Sigma |
| 8. Tris-HCl | Sigma |
| 9. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) | Sigma |
| 10. Bromofenol blue | Sigma |
| 11. Glisin | Sigma |
| 12. Amonyumpersülfat (APS) | Sigma |
| 13. Hidroklorik asit (HCl) | Sigma |
| 14. Etanol (CH ₃ CH ₂ OH) | Sigma |
| 15. Guanidin hidroklorür | Sigma |
| 16. Bütillenmiş hidroksi anisol (BHT) | Merck |
| 17. Potasyum asetat (CH ₃ COOK) | Merck |
| 18. Folin ciocalteu's fenol reaktifi | Merck |
| 19. Potasyum ferrisiyanit (K ₃ Fe(CN) ₆) | Merck |
| 20. Trikloroasetik asit (TCA) | Merck |
| 21. Askorbik asit | Merck |
| 22. Sülfürik asit (H ₂ SO ₄) | Merck |
| 23. β-merkpto etanol | Fluka |
| 24. 2, 4-dinitrofenil hidrazin | Fluka |

| Malzeme | Marka |
|---|---------------|
| 25. 2-tiyobarbütirik asit (TBA) | Fluka |
| 26. Ferrozin | Fluka |
| 27. Dihidrojen potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄) | Fluka |
| 28. Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄) | Fluka |
| 29. Quercetin dihidrat | Fluka |
| 30. Etil asetat | Carlo-Erba |
| 31. Dimetil sülfoksit (DMSO) | Carlo-Erba |
| 32. Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃) | Sigma-Aldrich |
| 33. Etilendiamintetra astik asit (EDTA) | Sigma-Aldrich |
| 34. Alüminyum nitrat (Al(NO ₃)) | Sigma-Aldrich |
| 35. Metanol (CH ₃ OH) | Sigma-Aldrich |

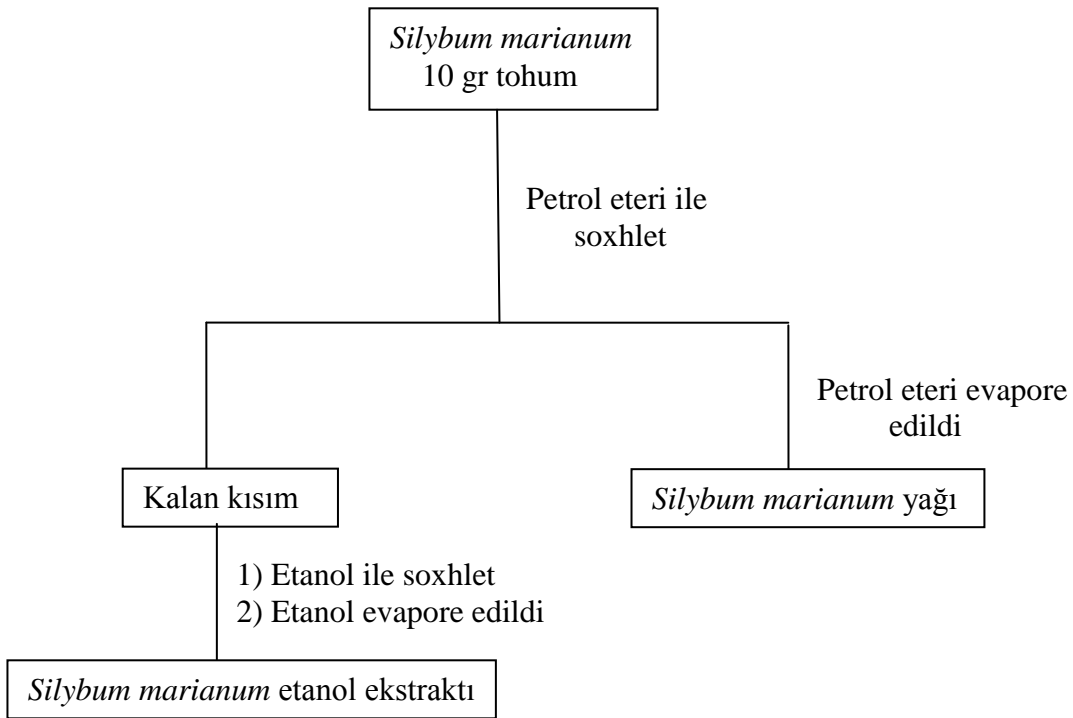
3.1.3. Kullanılan Aletler

1. Varian marka, Cary 100 Bio model UV-VIS Spektrofotometre
2. Bio Rad Gel Doc XR marka, Jel Görüntüleme Sistemi
3. Bio Rad mini protean marka, Elektroforez
4. Hettich marka, Universal 320 R model, Santrifüj
5. Heraus marka, Sterilizatör
6. Hiramaya marka, Otoklav
7. Metler Toledo marka, Terazî
8. Heiidolph marka, Vortex
9. Metler Toledo marka, pH –metre
10. Heiidolph marka, Laborota 4000 model, Soxhlet
11. Bibby Strilin Ltd marka, RE-100B model Evaporatör
12. Sanyo marka, Derin dondurucu
13. Arçelik marka, Buzdolabı
14. Arçelik marka, Mikrodalga fırın
15. Memmert marka, Çalkalayıcı
16. Ependorf marka, Mikropipet
17. Schleicher-Schvell marka, Membran filtresi
18. Öğütücü

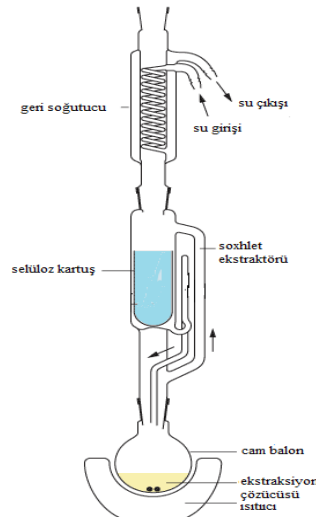
3.2. METOT

3.2.1. Bitki Tohumunun Etanol Ekstraktının Hazırlanması

Bitki tohumu öğütücü yardımıyla iyice öğütüldü. *Silybum marianum* bileşiklerinin ekstraksiyonu yağının çıkarılması ve etanol ekstraktının elde edilmesi olmak üzere iki adımda gerçekleştirildi. Bunun için Soxhlet düzeneği kuruldu. Bitki tohumu iki selüloz kartuşda da 10 gr olacak şekilde tartıldı. Önce 370 ml petrol eteri ile ekstraksiyon işlemi başlatıldı. Elde edilen çözeltilerin çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Daha sonra 350 ml etanol ile ekstraksiyon işlemi başlatıldı. Elde edilen çözeltilerin çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Yapılan tüm işlemler 2 kez tekrarlandı ve bu işlemlerin sonunda 1.0786 gr sarı renkli etanol ekstraktı elde edildi. Elde edilen etanol ekstraktı ve bitki yağı 4 °C’de renkli cam şişelerde saklandı.



Şekil 3.3. Bitki tohumunun etanol ekstraktının hazırlanmasının şematik gösterimi



Şekil 3.4. Soxhlet düzeneği

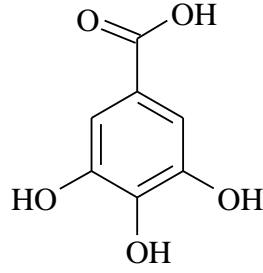
3.2.2. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteus yöntemine göre belirlendi (Singleton ve ark. 1999). Standart olarak gallik asit kullanıldı (Şekil 3.5). Gallik asitin 0.5 mg/ml'lik stok çözeltisi etanol içinde hazırlandı. Bu stok çözeltiden 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. *Silybum marianum* ekstaktının 0.5 mg/ml'lik çözeltisi etanolde hazırlandı. Daha sonra konsantrasyonlarına göre gallik asitten ve ekstrakt çözeltisinden 40 µl alınıp, üzerlerine 1160 µl saf su ve 200 µl 2N folin reaktifinden ilave edilip iyice karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 600 µl % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldı. Oluşan karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalandı. Bu sürenin sonunda UV'de 765 nm'de absorbans ölçüldü.

Galik asidin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0024 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g}) \quad (R^2=0.9967)$$

Bu eşitlik kullanılarak *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer (GAE) olarak hesaplandı.



Şekil 3.5. Gallik asit

3.2.3. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

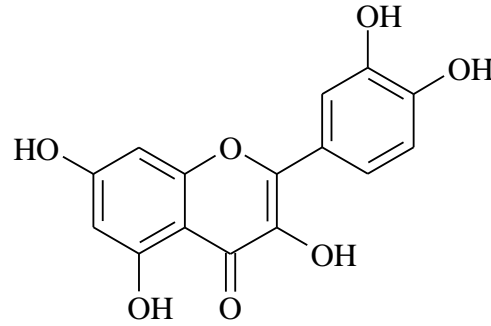
S. marianum tohumunun etanol ekstraktının toplam flavonoid bileşen tayini Zhishen ve ark. (1999) tarafından tanımlanan yöntem ile tayin edildi. Standart olarak quercetin kullanıldı (Şekil 3.6). Bu yöntemin dayandığı temel prensip quercetin içindeki flavonoid bileşen miktarını quercetin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktı içindeki toplam flavonoid bileşen miktarını quercetine eşdeğer olarak hesaplamaktır.

Quercetin metanol içindeki 100 µg/ml'lik stok çözeltisinden 1, 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. *Silybum marianum* ekstraktının 0.5 mg/ml'lik çözeltisi etanolde hazırlandı. Daha sonra deney ortamına 0.1 ml % 10'luk $Al(NO_3)_3$, 0.1 ml 1M CH_3COOK ve 3.8 ml metanol bırakıldı. Bu karışım üzerine konsantrasyonlarına göre 1ml quercetin ve 1 ml ekstrakt çözeltisinden kendi deney tüplerine eklenip karışım iyice karıştırıldı. Sonra elde edilen son karışım 25 °C'deki su banyosunda 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV'de 415 nm'de absorbans ölçüldü.

Quercetin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.028 \times \text{quercetin } (\mu\text{g}) \quad (R^2 = 0.9999)$$

Bu eşitlik kullanılarak *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer (QUE) olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. Quercetin

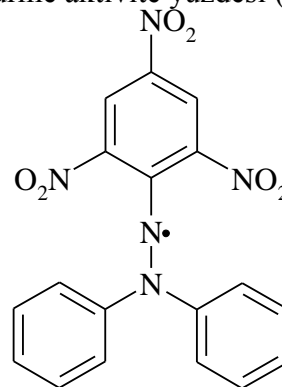
3.2.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının DPPH radikalini (Şekil 3.7) söndürme aktivitesi DPPH metodu kullanılarak belirlendi (Blois 1958, Shimada ve ark. 1992). Bu yöntemde BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrollerin ve bitki ekstraktının 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. 0.1 mM DPPH çözeltisi metanolde hazırlandı. Tohum ekstraktının ve pozitif kontrollerin seyreltilmiş çözeltilerinden konsantrasyonlarına göre 3 ml alındı ve üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Tüplerde oluşan karışım iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV'de 517 nm'de absorpsiyon ölçüldü. Bu metotta negatif kontrol olarak 3 ml metanol ve 1 ml 0.1 mM DPPH karışımı kullanılırken kör olarak da 4 ml etanol kullanıldı.

Sonuç olarak artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

% I = DPPH radikalini söndürme aktivite yüzdesi (yüzde inhibisyon)



Şekil 3.7. DPPH Radikali

3.2.5. İndirgeme Gücü

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının indirgeme gücü Oyaizu (1986) metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrollerin ve tohum ekstraktlarının 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 1ml alınıp üzerlerine 2.5 ml fosfat tamponu (0.2 M, pH=6.6) ve 2.5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] ilave edildi ve karışım iyice karıştırıldıktan sonra 50 °C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda karışıma 2.5 ml %10'luk trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve karışım iyice karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. İki faza ayrılan karışımın üst tabakasından 2.5 ml alınıp üzerine sırasıyla 2.5 ml saf su ve 0.5 ml % 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldı. Sonra bu karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda UV'de 700 nm'de absorbans ölçüldü ve artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi. Bu metotta negatif kontrol ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir.

Reaksiyon karışımının yüksek absorbansı yüksek indirgeme gücünü gösterir.

3.2.6. H_2O_2 Söndürme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının hidrojen peroksit (H_2O_2) söndürme aktivitesi Zhao ve ark. (2006)'nın metoduna göre belirlendi. Bu metotta askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol ve bitki ekstraktının 2.5 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. Deney iki yol izlenerek yapıldı. Birinci yolda 0.5 ml 0.1 mM H_2O_2 ve 100 µg/ml konsantrasyondaki ekstrakt ve pozitif kontrolden 1 ml alındı. Bu karışım üzerine 100 µl %3'lük amonyum molibdat, 10 ml 2 M sülfürik asit (H_2SO_4) ve 7 ml 1.8 M potasyum iyodür (KI) eklendi. Sarı renkli olan bu karışım sarı rengi kaybolana kadar 5 mM sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) ile titre edildi. İkinci yolda ise 1 ml 0.1 mM H_2O_2 ve 100 µg/ml konsantrasyondaki ekstrakt ve pozitif kontrolden 0.5 ml alındı. Bu karışım üzerine 100 µl % 3'lük amonyum molibdat, 10 ml 2 M sülfürik asit (H_2SO_4) ve 7 ml 1.8 M potasyum iyodür (KI) ilave edildi. Sarı renkli olan bu karışım yine sarı rengi kaybolana kadar 5 mM $Na_2S_2O_3$ ile titre edildi.

Her iki yolda da ekstraktın hidrojen peroksit söndürme aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\text{Hidrojen peroksit söndürme aktivitesi (\%)} = [(V_0 - V_1) / V_0] \times 100$$

V_0 =Kontrol numunesinin titrasyonu için kullanılan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ çözeltisinin hacmi

V_1 =*S. marianum* tohumunun etanol ekstraktı ve pozitif kontrol için kullanılan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ çözeltisinin hacmi

Bu metotta kullanılan kontroller askorbik asit için saf su, ekstrakt için etanoldür.

3.2.7. Protein Oksidasyonu Tayini

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının protein oksidasyonu Wang metoduna göre belirlendi (Wang ve ark. 2006). Bu metotta pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Negatif kontrol olarak pozitif kontrol ve ekstrakt içermeyen test örneği kullanıldı. Bitki ekstraktının ve pozitif kontrolün 2.5 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. Deney tüpüne sırasıyla 800 µl 20 mM pH=7.4 potasyum fosfat tamponu veya ekstrakt ve pozitif kontrolün konsantrasyona bağlı seyreltik çözeltileri 4 mg/ml'lik konsantrasyonda 400 µl BSA, 50 µM 400 µl FeCl_3 , 1 mM 400 µl H_2O_2 ve 100 µM 400 µl askorbik asit ilave edildi. Toplam hacmi 1.2 ml olan karışım daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdaki örneklerin protein karbonil bileşenini belirlemek için karışıma 2 M HCl'deki 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazinin (DNPH) 2 ml'si ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda karışıma % 10'luk soğuk trikloroasetik asitten (TCA) 2 ml ilave edildi ve karışım 15 dakika buz banyosunda bekletildi. Bu sürenin sonunda karışım 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santifüjlendi. Santifüj sonunda oluşan protein pelleti etanol/etil asetat (1:1) karışımının 2 ml'si ile 3 defa yıkandı ve pellet guanidin hidokloridin (6 M, pH=2.3) 2 ml'si ile çözüldü. Bu işlemin sonunda UV'de 370 nm'de absorbans ölçüldü.

Sonuç olarak artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\%I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.8. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi tiyobarbitürik asit (TBA) metoduna göre belirlendi (Lo ve Cheung 2005). Bu metotta pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) kullanıldı. Negatif kontrol olarak pozitif kontrol ve ekstrakt içermeyen test örneği kullanıldı. Bitki ekstraktının ve pozitif kontrolün 0.5 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 5, 10, 25, 50, 100 ve 250 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. Daha sonra deney tüpüne önceden hazırlanmış olan karaciğer homojenatından (süpernatant) 100 µl alındı ve üzerine sırasıyla 200 µl ekstrakt ve pozitif kontrolün konsantrasyonlarına göre seyreltilmiş çözeltileri, 100 µl 10 µM FeCl₃ ve 100µl 0.1 mM askorbik asit ilave edildi. Karışım vortexle iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışım üzerine 500 µl % 28'lik trikloroasetik asit (TCA) ve 380 µl % 2'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ilave edildi ve karışım 20 dakika 100 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örnekler buz üzerinde soğutuldu. Daha sonra reaksiyon karışımı 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Bu işlemin sonunda UV'de 532 nm'de süpernatant'ın absorbansı ölçüldü.

Sonuç olarak artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\%I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂/Fe⁺³/askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasarını koruyucu etkisi elektroforetik olarak incelendi. Pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Pozitif kontrol ve tohum ekstraktından 6 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltik çözeltiler hazırlandı. BSA 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7.4) içinde çözüldü. Deney tüpüne sırasıyla 200 µl potasyum fosfat tamponu (pH=7.4) veya ekstrakt ve pozitif kontrolün konsantrasyonuna bağlı seyreltik çözeltileri, 200µl BSA, 200 µl 1.0 mM FeCl₃, 200 µl 3.0 mM EDTA, 200 µl 2.5 mM H₂O₂ ve 200 µl 1.0 m M askorbik asit ilave edildi. Toplam hacmi 1.2 ml olan karışım 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilmiş reaksiyon karışımı Laemli's (1970) metodu kullanılarak % 10'luk

sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel (SDS-PAGE) içinde elektroforezle analiz edildi. Örnekler tamponla (Tris HCl pH=6.8, % 2 SDS, %5 2-merkaptto etanol, % 10 sükröz ve % 0.002 bromofenol blue) eşit hacimde karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 5 dakika 100 °C'de ısıtıldı. Bu süre sonunda her bir örnekten 10 µl elektroforez kuyucuklarına yüklendi. Jel BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak minijel için 25 mAmp sabit bir değer ve maximum voltajda yürütücü tamponla (Tris HCl pH=6.8, % 2 SDS, % 5 2-merkaptto etanol, %10 sükröz ve % 0.002 bromofenol blue) BioRad tankında yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller % 15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 2 saat süreyle renklendirildi. Daha sonra boya çıkarma solüsyonu (su: meteo: glasiyel asetik asit: 6: 3: 21 v:v:v) ile jellerden boya çıkarıldı. Daha sonra bu jeller jel görüntüleme sistemiyle dijital olarak fotoğraflandırdı.

3.2.10. Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması

Protein hasarının miktarını ve band yoğunluğunu belirleme jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantlar Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grubla standardize edildi. Sonuçlar 3 farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

3.2.11. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

S. marianum tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının ve yağının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin agaroz jel elektroforezi pBluescript M13(+) plazmit DNA üzerinde kontrol edildi. Plazmit DNA, Qiagene plazmit miniprep kiti kullanılarak izole edildi (Kızıllı ve ark. 2003). Plazmit DNA, tohum ekstraktının farklı konsantrasyondaki çözeltileri varlığında H₂O₂+UV işlemiyle okside edildi ve Attaguile metodunda yapılan modifikasyon ile agaroz jel (%1) üzerinde kontrol edildi (Attaguile ve ark. 2000). Agaroz (1 gr) trisasetat tamponuna (100 ml; 40 mM tris asetat, 1 mM EDTA, pH=8.2) ilave edildi ve karışım jelin çözünmesi için mikrodalga fırında 3 dakika kadar kaynatıldı. Bu sürenin sonunda jel yaklaşık 60 °C'ye gelinceye kadar soğumaya bırakıldı. Daha sonra 1.5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi ve karıştırıldı. Çözelti kenarları otoklav bandıyla sarılmış ve tarak yerleştirilmiş cam tabakaya döküldü. Jel donması için oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Tohum ekstraktı ve

yağından 10 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözelti 1 ml'lik ependorfda hazırlandı. Deneyler, toplam hacim 10 µl olacak şekilde, fosfat tamponu (7.14 mmol fosfat ve 14.29 mmol NaCl, pH=7.4) içerisinde, her tüp 200 ng plazmit DNA, 2.5 mmol/l H₂O₂ ve sırasıyla 100, 500, 750, 1000 µg/ml konsantrasyonda etanol ekstraktı ve yağının varlığında ve yokluğunda gerçekleştirildi. Reaksiyonlar oda sıcaklığında 300 nm'de UV transillüminatör (8000 µW cm⁻¹) yüzeyinde UV ışınlamasıyla başlatıldı ve 3 dakika devam edildi. Işınlamadan sonra her tüpe 3µl yükleme tamponu eklendi ve örnekler agaroz jele (% 1) yüklendi. Elektroforez 3 saat 40 V'ta yapıldı. İşlem görmemiş pBluescript M13(+) plazmit DNA, yalnızca UV uygulanmış ve yalnızca H₂O₂ eklenmiş plazmit DNA kontrol olarak kullanıldı. DNA zincir kesiminin yüzde (%) inhibisyonu aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Fukuhara ve Miyata 1998).

$$\%I = 1 - [(S_{m+a} - S_c) / (S_m - S_c)] \times 100$$

S_c =Kesilmemiş kontrol DNA'daki supercoiled formunun yüzdesi

S_m =DNA'nın kesimini önleyen madde dışındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesi

S_{m+a} =DNA'nın kesimini önlediği düşünülen maddenin varlığındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesi

3.2.12. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS for 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar

Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg/ml'lik çözeltisinin içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteus yöntemine göre gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Gallik asidin 0.5 mg/ml'lik stok çözeltisinden 50-400 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorbans değerleri 765 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen bu absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.1) ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.0024 \times \text{gallik asit } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak tohum ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı.

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg'nın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı 310 ± 4.93 µg gallik aside eşdeğer olarak bulundu (Çizelge 4.1).

4.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg/ml'lik çözeltisinin içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı Zhishen, Mengcheng ve Jianming (1999) tarafından tanımlanan yöntem ile quercetine eşdeğer olarak hesaplandı. Quercetin'in 1 mg/ml'lik stok çözeltisinden 1-25 µg/ml'lik konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığına karşılık gelen absorbans değerleri 415 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçülen bu absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.2) ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.028 \times \text{quercetin } (\mu\text{g})$$

Bu eşitlik kullanılarak tohum ekstraktının toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eş değer olarak hesaplandı.

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg'nın içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı 19.66 ± 0.11 µg quercetine eşdeğer olarak bulundu (Çizelge 4.2).

4.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi DPPH metodu kullanılarak belirlendi. Bu metotta BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrollerin ve tohum ekstraktının 0.5 mg/ml'lik stok çözeltilerinden 5-150 µg/ml'lik konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı. 517 nm'de absorbans ölçüldü ve ölçülen değerler aşağıdaki eşitlik kullanılarak % inhibisyon olarak hesaplandı. Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.3).

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

DPPH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-150 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu aralıkta *S. marianum* 14.69±3.96 – 91.95±5.20 arasında pozitif kontrol olan BHT 39.22±7.25 – 87.98±5.66 arasında ve BHA 74.64±4.29 – 87.85±2.09 arasında % inhibisyon gösterdi (Çizelge 4.3).

4.4. İndirgeme Gücü

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının indirgeme gücü Oyaizu (1986) metoduna göre belirlendi. Bu metotta BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrollerin ve tohum ekstraktının 0.5 mg/ml'lik stok çözeltilerinden 5-150 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltileri hazırlandı. 700 nm'de absorbans ölçüldü ve artan konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

İndirgeme gücü aktivitesi incelenirken 5-150 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu aralıkta *S. marianum* 0.05±0.00–0.15±0.01 arasında pozitif kontrol olan BHT 0.06±0.00–0.46±0.07 arasında ve BHA 0.08±0.00–0.83±0.08 arasında indirgeme gücü gösterdi (Çizelge 4.4.).

4.5. H₂O₂ Söndürme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının hidrojen peroksit (H₂O₂) söndürme aktivitesi Zhao, Xiang, Ye, Yuan ve Guan (2006) metoduna göre belirlendi. Bu metotta pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanıldı. Tohum ekstraktının ve pozitif kontrolün 2.5 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Tek konsantrasyondaki bu çözeltiler kullanılarak titrasyonla bitki ekstraktının ve pozitif kontrolün H₂O₂ söndürme aktivitesi

gözlemlendi ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Konsantrasyona karşı % H₂O₂ söndürme aktivite değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ Söndürme aktivitesi (\%)} = [(V_0 - V_1)/V_0] \times 100$$

V₀=Kontrol numunesinin titrasyonu için kullanılan Na₂S₂O₃ çözeltisinin hacmi

V₁=Pozitif kontrol ve *S. marianum* etanol ekstraktı için kullanılan Na₂S₂O₃ çözeltisinin hacmi

Çalışılan konsantrasyonda (2.5 mg/ml) *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂ söndürme aktivitesi % 57.1±0.04 olarak bulunurken pozitif kontrol olan askorbik asidin H₂O₂ söndürme aktivitesi % 60.5±0.01 olarak bulundu (Çizelge 4.5).

4.6. Protein Oksidasyonu Tayini

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme etkisi Wang (2006) metoduna göre belirlendi. Bu metotta pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Tohum ekstraktının ve pozitif kontrolün 2.5 mg/ml'lik konsantrasyondaki stok çözeltilerinden 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltileri hazırlandı. 370 nm'de absorbans ölçüldü ve ölçülen değerler aşağıdaki eşitlik kullanılarak % inhibisyon olarak hesaplandı. Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})/A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Protein oksidasyonu incelenirken 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu aralıkta *S. marianum* 9.16±0.61 – 86.27±1.01 arasında pozitif kontrol BHT 12.56±0.9 – 49.23±1.35 arasında % inhibisyon gösterdi (Çizelge 4.6).

4.7. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi tiyobarbitürik asit (TBA) metoduna göre belirlendi. Bu metotta pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Tohum ekstraktının ve pozitif kontrolün 0.5 mg/ml'lik konsantrasyondaki stok çözeltilerinden 5-250 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı. 532 nm'de absorbans ölçüldü ve ölçülen değerler aşağıdaki eşitlik

kullanılarak % inhibisyon olarak hesaplandı. Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7)

$$\% I = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Tohum ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 5-250 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *S. marianum*'un lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi % 5.87±0.25 – 26.14±0.72 arasında, pozitif kontrol BHT'nin lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi % 12.17±0.51 – 31.40±0.63 arasında bulundu (Çizelge 4.7).

4.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂/Fe³⁺/askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasarını koruyucu etkisi elektroforetik olarak incelendi. Pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Tohum ekstraktının ve pozitif kontrolün 6 mg/ml'lik konsantrasyondaki stok çözeltilerinden 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan bu seyreltik çözeltiler H₂O₂/Fe³⁺/askorbik asit sistemiyle 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilmiş reaksiyon karışımı Laemmli's (1970) metoduna göre sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) içinde elektroforezle analiz edildi. Jel görüntüleme sistemiyle protein hasar miktarı ve band yoğunluğu belirlendi. Quantity One Programme sistemiyle jeller üzerindeki bantların miktarı belirlendi. Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grupla standardize edildi.

Tohum ekstraktının protein oksidasyonuna koruyucu aktivitesi incelenirken 50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *S. marianum* etanol ekstraktının % 75.74±2.9 – 92.92±3.3 arasında band yoğunluğuna ve H₂O₂/Fe³⁺/askorbik asit sistemiyle başlatılan BSA oksidasyonu üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.8A-B). Pozitif kontrol olan BHT'nin aynı konsantrasyon aralığında % 54.92±4.1 – 96.73±4.1 arasında band yoğunluğuna sahip olduğu ve H₂O₂/Fe³⁺/askorbik asit sistemiyle başlatılan BSA'da oluşturulan oksidatif hasarı hemen hemen tamamiyle önlediği gözlemlendi (Şekil 4.9A-B).

4.9. DNA Agaroz Jel Elektrofrezisi

S. marianum tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının ve yağının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline (\cdot OH) karşı koruyucu etkilerinin agaroz jel elektrofrezisi pBluescript M13(+) plazmit DNA üzerinde kontrol edildi. Plazmit DNA, bitki yağı ve ekstraktının farklı konsantrasyondaki çözeltileri varlığında H₂O₂+UV işlemiyle okside edildi ve Attaguile metodunda yapılan modifikasyon ile agaroz jel (%1) üzerinde kontrol edildi (Attaguile ve ark. 2000). Bu metoda göre bitki ekstraktı ve yağının 10 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltilerinden 100-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında seyreltik çözeltiler hazırlandı. Bu konsantrasyon aralığında hazırlanmış reaksiyon karışımı etidyum bromür varlığındaki elektrofrezis ile analiz edildi. İşlem görmemiş pBluescript M13(+) plazmit DNA, yalnızca UV uygulanmış ve yalnızca H₂O₂ eklenmiş plazmit DNA kontrol olarak kullanıldı. DNA zincir kesiminin yüzde (%) inhibisyonu aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Fukuhara ve Miyata 1998). Artan ekstrakt konsantrasyonuna karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.12).

$$\%I = 1 - [(S_{m+a} - S_c) / (S_m - S_c)] \times 100$$

S_c =Kesilmemiş kontrol DNA'daki supercoiled formunun yüzdesi

S_m =DNA'nın kesimini önleyen madde dışındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesi

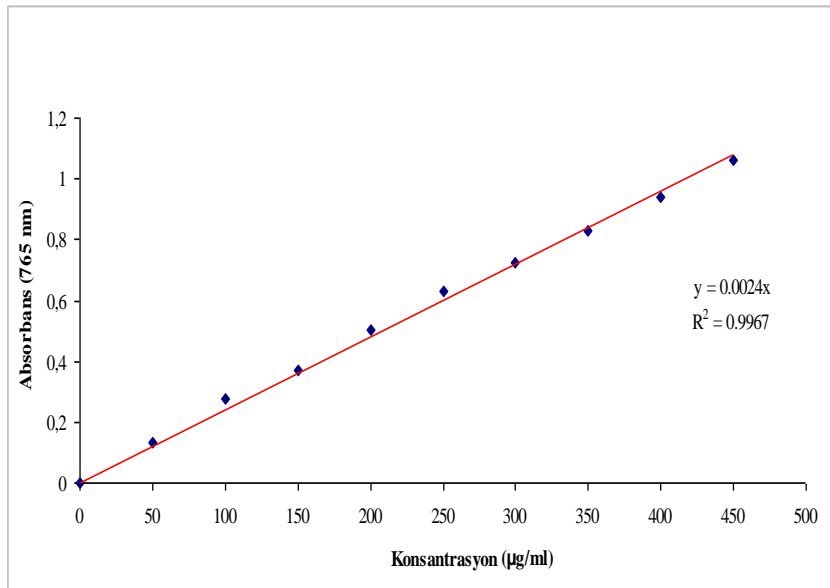
S_{m+a} =DNA'nın kesimini önlediği düşünülen maddenin varlığındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formunun yüzdesi

Tohum ekstraktı ve yağının DNA'yı hidroksil radikaline (\cdot OH) karşı koruma aktivitesi incelenirken 100-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline (\cdot OH) karşı koruyucu etkisi % 4.72 – 82.80 arasında bulundu (Şekil 4.10A-B). *S. marianum* yağının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline (\cdot OH) karşı koruyucu etkisi % 1.22 – 35.07 arasında bulundu (Şekil 4.11A-B).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.1. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının gallik aside eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarı. Elde edilen değer üç (n = 3) deney sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)

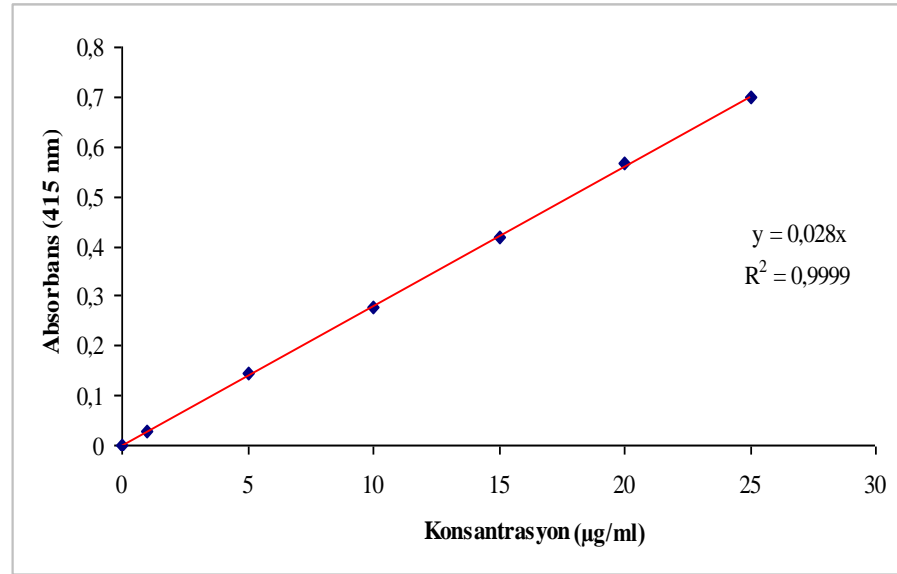
| Toplam Fenolik Bileşen | |
|---|--|
| Madde | Gallik asit eşdeğeri (μg GAE/mg ekstrakt) |
| <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktı | 310 \pm 4.93 |



Şekil 4.1. Gallik asidin artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri

Çizelge 4.2. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının quercetine eşdeğer toplam flavonoid bileşen miktarı. Elde edilen değer üç (n = 3) deney sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)

| Toplam Flavonoid Bileşen | |
|---|---|
| Madde | Quercetin Eşdeğeri ($\mu\text{g QUE}/\text{mg}$ ekstrakt) |
| <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktı | 19.66 \pm 0.11 |

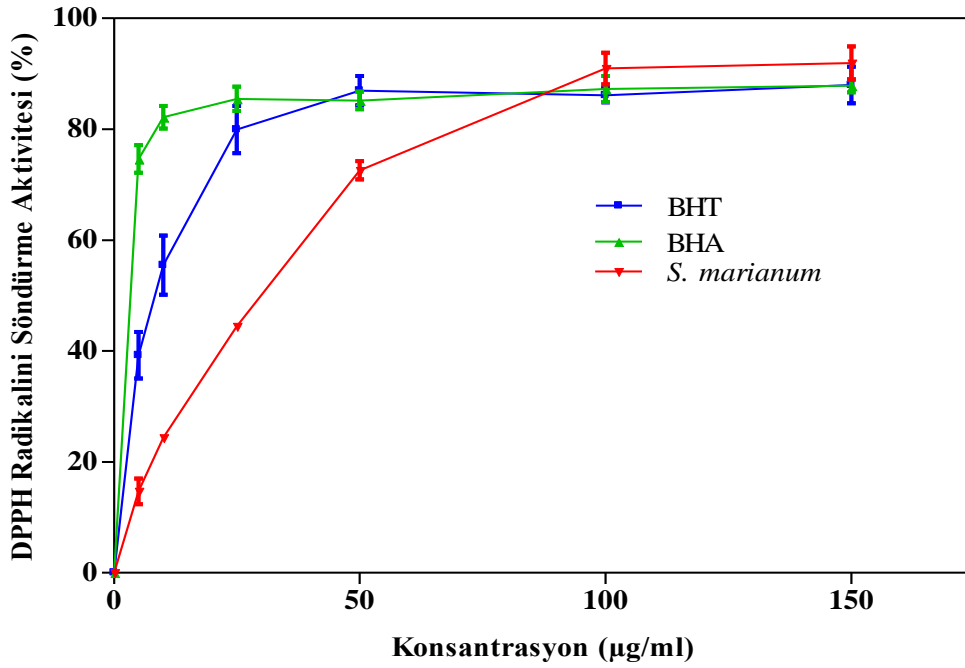


Şekil 4.2. Quercetin'in artan konsantrasyonlarına karşılık ölçülen absorbans değerleri

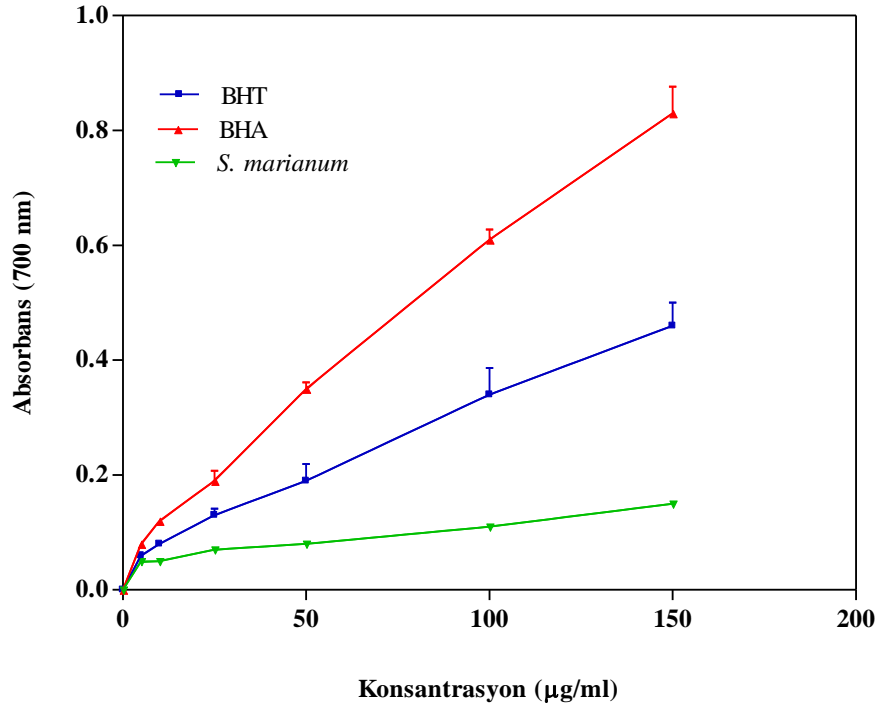
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.3. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktı, BHT ve BHA'nın DPPH radikalini söndürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p > 0.05)

| | Konsantrasyon (µg/ml) | | | | | |
|--------------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 | 150 |
| <i>S. marianum</i> | 14.69±3.96 | 24.38±0.97 | 44.43±0.44 | 72.59±2.84 | 90.95±4.89 | 91.95±5.20 |
| BHT | 39.22±7.25 | 55.49±9.27 | 79.33±7.38 | 86.96±4.56 | 86.14±2.21 | 87.98±5.66 |
| BHA | 74.64±4.29 | 82.17±3.53 | 85.48±3.82 | 85.19±2.75 | 87.27±4.04 | 87.85±2.09 |



Şekil 4.3. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p > 0.05)

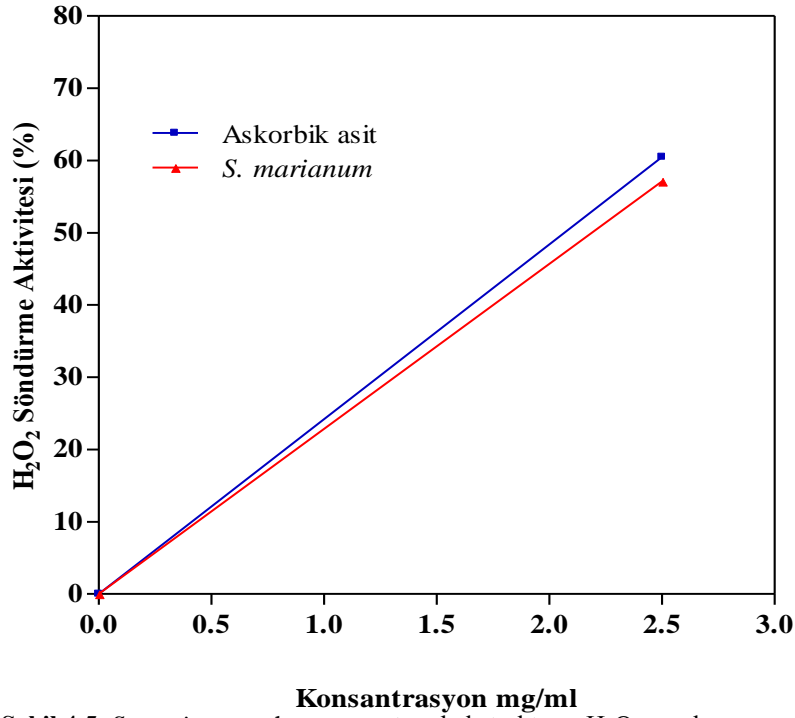


Şekil 4.4. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe³⁺ü Fe²⁺ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p > 0.05)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.5. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının ve askorbik asidin H₂O₂ söndürme aktivitesinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p > 0.05)

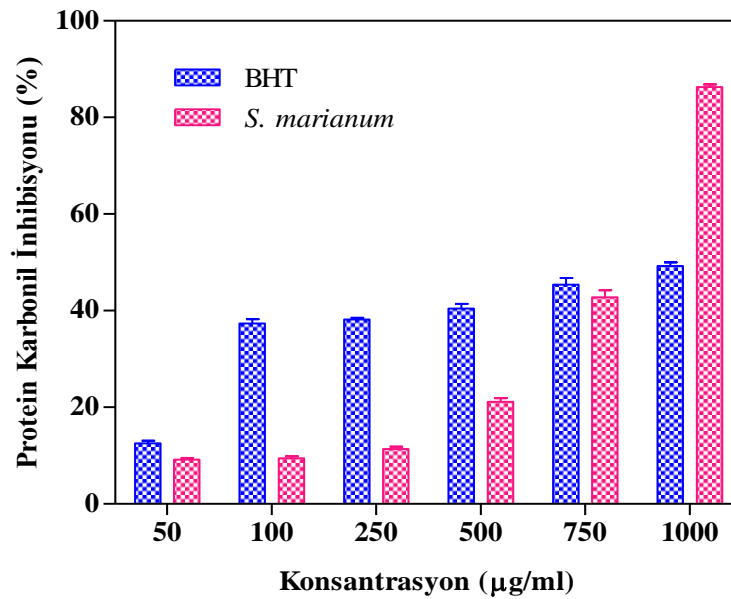
| Konsantrasyon | % İnhibisyon | |
|---------------|---|---------------|
| | <i>S. marianum</i> tohumunun etanol ekstraktı | Askorbik asit |
| 2.5 mg/ml | 57.1±0.04 | 60.5±0.01 |



Şekil 4.5. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂ söndürme aktivitesi. Askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p > 0.05)

Çizelge 4.6. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının ve BHT'nin protein oksidasyonu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)

| Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) | | 50 | 100 | 250 | 500 | 750 | 1000 |
|------------------------------------|--|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>S. marianum</i> | | 9.16 \pm 0.61 | 9.46 \pm 0.75 | 11.36 \pm 0.90 | 21.10 \pm 1.42 | 42.75 \pm 2.51 | 86.27 \pm 1.01 |
| BHT | | 12.56 \pm 0.9 | 37.33 \pm 1.53 | 38.16 \pm 0.57 | 40.43 \pm 1.72 | 45.40 \pm 2.32 | 49.23 \pm 1.35 |

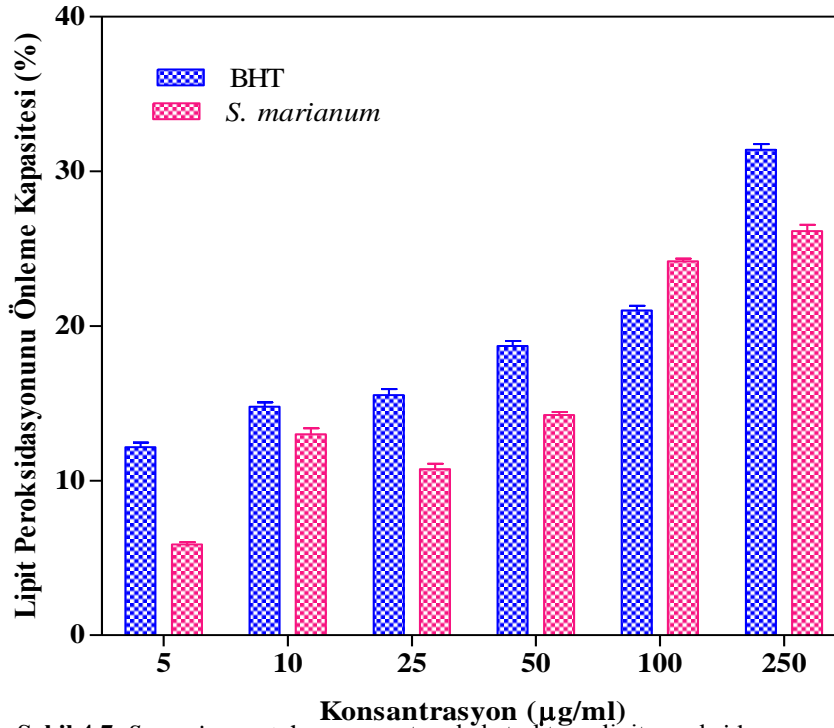


Şekil 4.6. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının protein oksidasyonu önleme aktivitesi. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. *S. marianum* etanol ekstraktının ve BHT'nin BSA üzerindeki inhibisyon etkisi Fenton sistemiyle ($\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /askorbik asit) başlatılan protein karbonil inhibisyonu olarak tanımlandı. Her noktada bulunan değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)

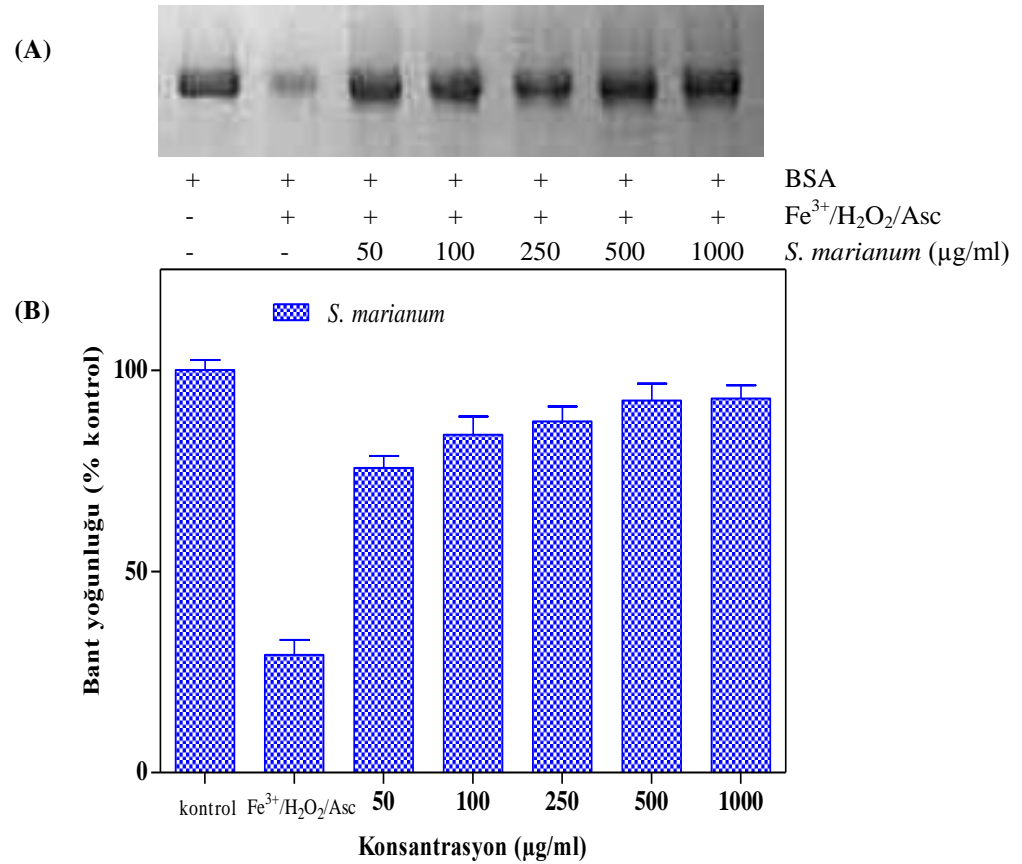
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.7. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının ve BHT'nin lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesinin % inhibisyon değerleri. Her değer üç deney (n = 3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)

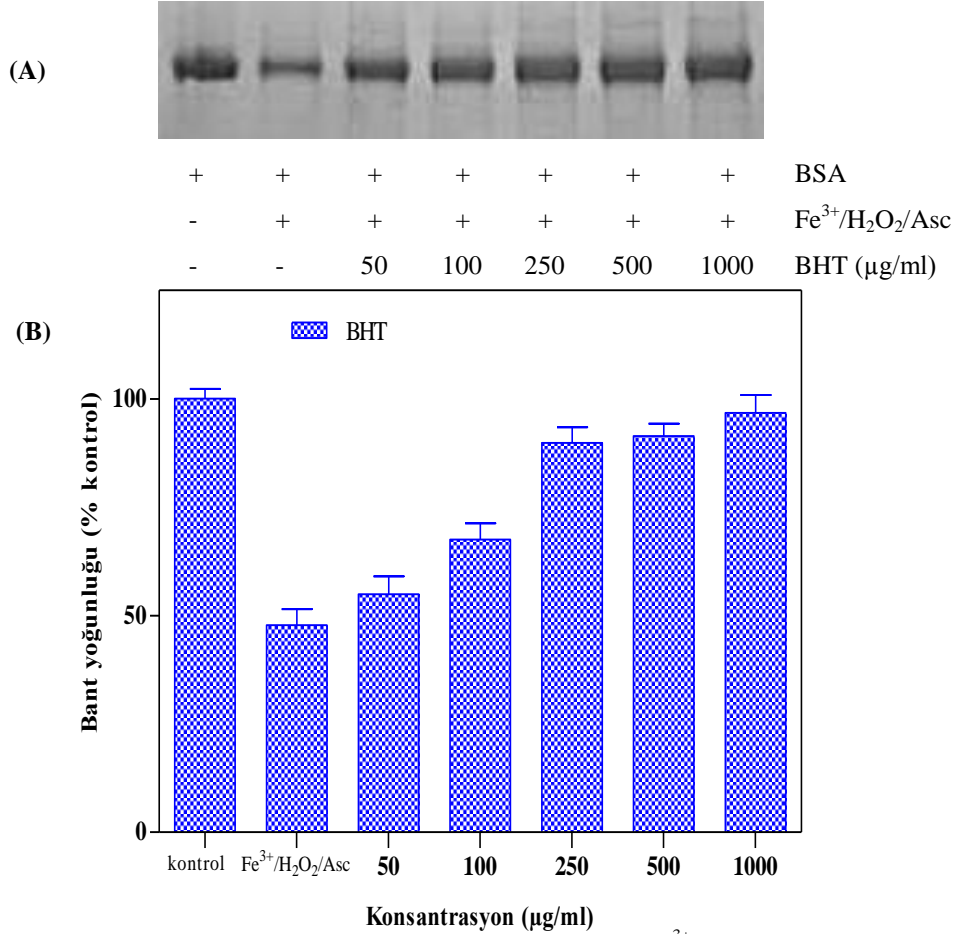
| Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) | | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 | 150 |
|------------------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>S. marianum</i> | | 5.87 \pm 0.25 | 12.99 \pm 0.69 | 10.75 \pm 0.57 | 14.25 \pm 0.31 | 24.19 \pm 0.31 | 26.14 \pm 0.72 |
| BHT | | 12.17 \pm 0.51 | 14.79 \pm 0.47 | 15.54 \pm 0.65 | 18.72 \pm 0.56 | 21.01 \pm 0.52 | 31.40 \pm 0.63 |



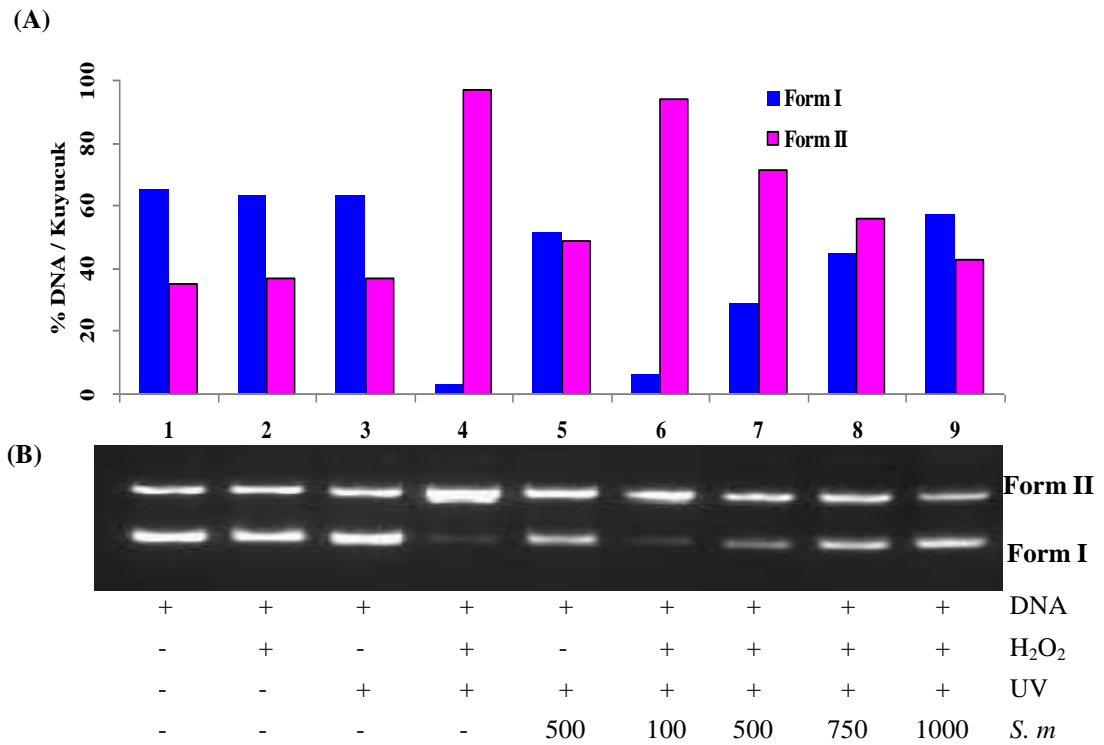
Şekil 4.7. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi. BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney (n=3) sonucunun ortalaması alınarak ve \pm standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir ($p > 0.05$)



Şekil 4.8(A). *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının Fe³⁺/H₂O₂/Askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile analizi. **1. kuyucuk:** BSA; **2. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc; **3. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+S. *m* (50 µg/ml); **4. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+S. *m* (100 µg/ml); **5. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+S. *m* (250 µg/ml); **6. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+S. *m* (500 µg/ml); **7. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+S. *m* (1000 µg/ml). **8(B).** *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının Fe³⁺/H₂O₂/Askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu aktivitesinin bant yoğunluğuna karşılık gelen densitometrik analizi. Her değer üç deney (n=3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p>0.05)

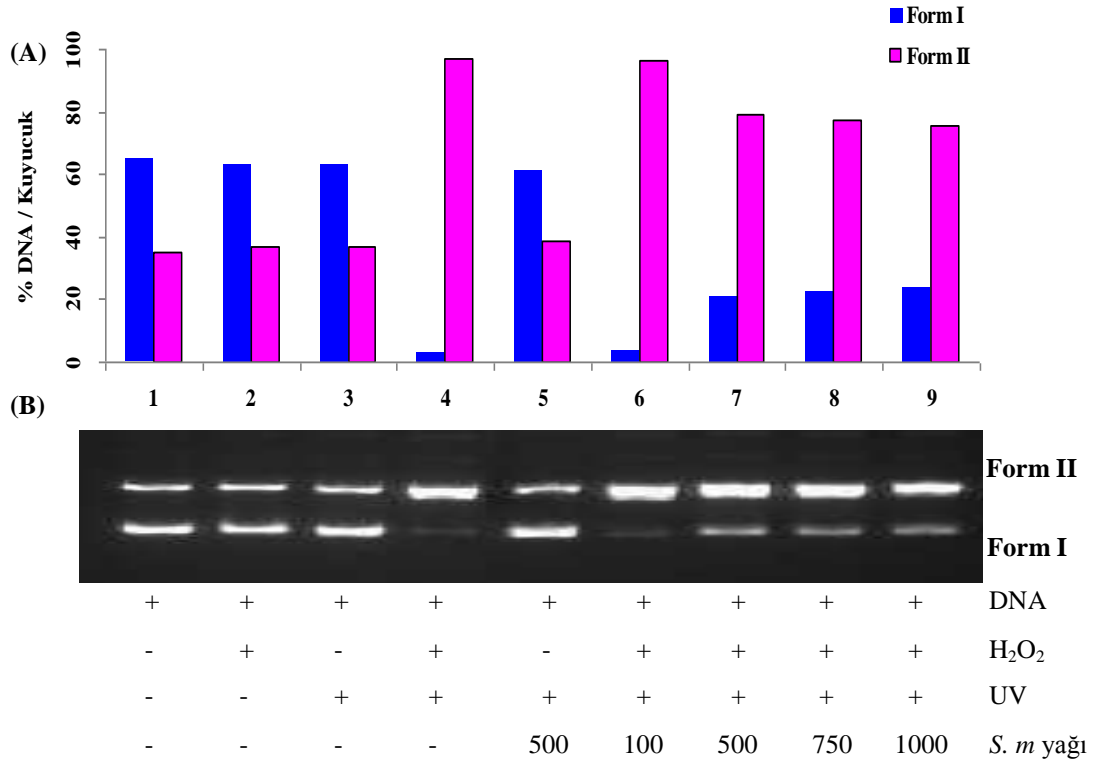


Şekil 4.9(A). Bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT) Fe³⁺/H₂O₂/Askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi. **1. kuyucuk:** BSA; **2. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc; **3. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+BHT (50 µg/ml); **4. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+BHT (100 µg/ml); **5. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+BHT (250 µg/ml); **6. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+BHT (500 µg/ml); **7. kuyucuk:** BSA+Fe³⁺/H₂O₂/Asc+BHT (1000 µg/ml) **9(B).** Bütillenmiş hidroksi toluenin (BHT) Fe³⁺/H₂O₂/Askorbik asit sistemi ile Bovin Serum Albumin (BSA) proteininde meydana getirilen oksidatif hasara karşı koruyucu aktivitesinin bant yoğunluğuna karşılık gelen densitometrik analizi. Her değer üç deney (n=3) sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (p>0.05)



Şekil 4.10 (A). *S. marianum* tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektforezinin her kuyucuktaki pBluescript M13(+) plazmit DNA'nın Form I ve Form II yüzdeleri.

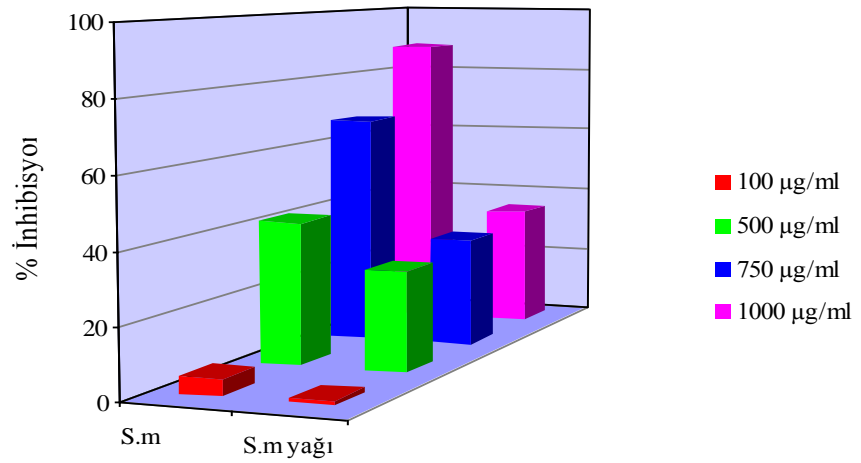
10 (B). *S. marianum* tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektforezi. Her kuyucuk 200 ng DNA ve 2.5 mmol/l H₂O₂ içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 3 dk yapıldı. **1. kuyucuk:** DNA; **2. kuyucuk:** DNA+H₂O₂; **3. kuyucuk:** DNA+UV; **4. kuyucuk:** DNA+H₂O₂+UV; **5. kuyucuk:** DNA+*S. m* (500 µg/ml)+UV; **6. kuyucuk:** DNA+*S. m* (100 µg/ml)+H₂O₂+UV; **7. kuyucuk:** DNA+*S. m* (500 µg/ml)+H₂O₂+UV; **8. kuyucuk:** DNA+*S. m* (750 µg/ml)+H₂O₂+UV; **9. kuyucuk:** DNA+*S. m* (1000 µg/ml)+H₂O₂+UV



Şekil 4.11 (A). *S. marianum* tohum yağının farklı konsantrasyonlardaki petrol eteri ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikale karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezinin her kuyucuktaki pBluescript M13(+) plazmit DNA'nın Form I ve Form II yüzdeleri. **11 (B).** *S. marianum* tohum yağının farklı konsantrasyonlardaki petrol eteri ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikale karşı koruyucu etkisinin Agaroz Jel Elektroforezi. Her kuyucuk 200 ng DNA ve 2.5 mmol/l H₂O₂ içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 3 dk yapıldı. **1. kuyucuk:** DNA; **2.kuyucuk:** DNA+H₂O₂; **3. kuyucuk:** DNA+UV; **4. kuyucuk:** DNA+H₂O₂+UV; **5. kuyucuk:** DNA+S. *m* yağı (500 µg/ml)+UV; **6. kuyucuk:** DNA+S. *m* yağı (100 µg/ml)+H₂O₂+UV; **7. Kuyucuk:** DNA+S. *m* yağı (500 µg/ml)+H₂O₂+UV; **8. kuyucuk:** DNA+ *S. m* yağı (750 µg/ml)+H₂O₂+UV; **9. kuyucuk:** DNA+S. *m* yağı (1000 µg/ml)+H₂O₂+UV

Çizelge 4.8. *S. marianum* tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktı ve yağının H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin % inhibisyon değerleri

| | Konsantrasyon (µg/ml) | | | |
|-------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|
| | 100 | 500 | 750 | 1000 |
| <i>S. marianum</i> | 4.72 | 41.08 | 66.95 | 87.80 |
| <i>S. marianum</i> yağı | 1.22 | 28.62 | 31.63 | 35.07 |



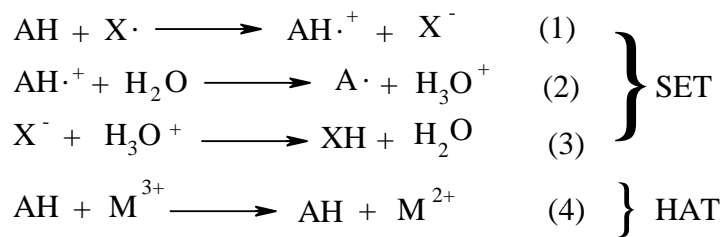
Şekil 4.12. *S. marianum* tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktı ve yağının H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikaline karşı DNA'yı koruyucu etkilerinin % inhibisyon grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

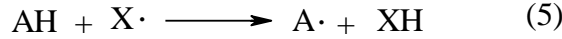
Son on yıl içinde kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların, yaşlanmanın ve kanserin gelişmesi ve ilerlemesinde serbest radikallerin bilinen etkilerinden dolayı yiyecek ve gıdaların antioksidant aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda bir artış olmuştur (García-Parrilla 2008). Bu amaç için çoğu farklı prosedür gıdaların toplam antioksidant kapasitesini test etmek için geliştirilmiştir (Pellegrini ve ark. 2003; Pérez-Jiménez ve Saura-Calixto 2005).

Antioksidant özelliklerin belirlenmesi için ideal bir yöntem reaksiyon şartlarında bulunan gıda bileşiklerinin reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) tarafından *in vivo* olarak başlatılan oksidatif stres üzerindeki etkisini benzerleriyle değerlendirmektir (Magalhães ve ark. 2009).

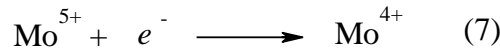
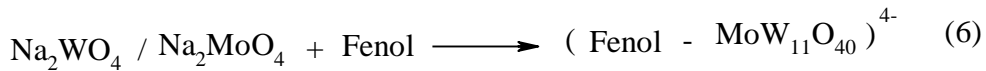
Gıda bileşenlerinin antioksidant kapasitesini belirlemek için kullanılan metotlar genellikle iki temel gruba ayrılırlar ve iki temel mekanizmayla radikalleri söndürebilirler. Bunlar; tek elektron transferine (SET) dayanan analizler ve hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan analizlerdir. SET'e bağlı metotlar metalleri, karbonilleri ve radikalleri içeren herhangi bir bileşiği indirgemek için bir elektron transfer eden potansiyel bir antioksidantın kapasitesini belirler (reaksiyon 1-3). SET analizi indirgenmiş bir oksidantın rengindeki değişim boyunca gözlenir (Huang ve ark. 2005). SET metotlarındaki bağlı reaktivite aslında reaktif fonksiyonel grubun iyonizasyon (Wright ve ark. 2001) ve protondan arındırma (bir molekülden hidrojen iyonlarını ayrıştırma) (Lemanska ve ark. 2001) potansiyeline bağlıdır. Bu yüzden SET reaksiyonları pH'ya bağlıdır. Genellikle iyonizasyonun potansiyel değerleri pH'ın artmasıyla azalır Çünkü reaktif fonksiyonel grubun protondan arındırma ile elektron verme kapasitesi artar. SET reaksiyonları genellikle yavaştır ve tamamlanması uzun zaman gerektirebilir, bu yüzden antioksidant kapasite hesaplamaları kinetikten ziyade ürünlerdeki yüzde azalmaya dayanır.



HAT'a bağılı metotlar hidrojen atomu vericisi olarak bir antioksidantın serbest radikalleri söndürme kapasitesini ölçer (reaksiyon 4). HAT reaksiyonları çözücü ve pH'den bağımsızdırlar ve HAT reaksiyonları genellikle oldukça hızlıdırlar, tipik olarak iki dakikada tamamlanırlar. Metaller gibi indirgeyici ajanların varlığı HAT analizlerini zorlaştırır ve bu ajanlar yanlışlıkla yüksek görünen reaktiviteye neden olabilir (Prior ve ark. 2005). HAT reaksiyonuna bağılı metotlarda, antioksidant hidrojen atomu vererek serbest radikalleri söndürebilir (reaksiyon 5).

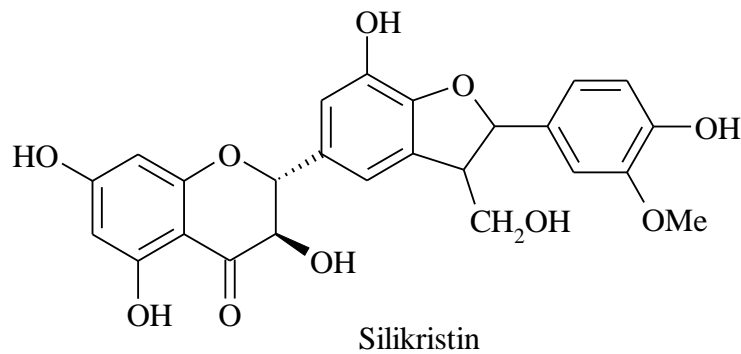
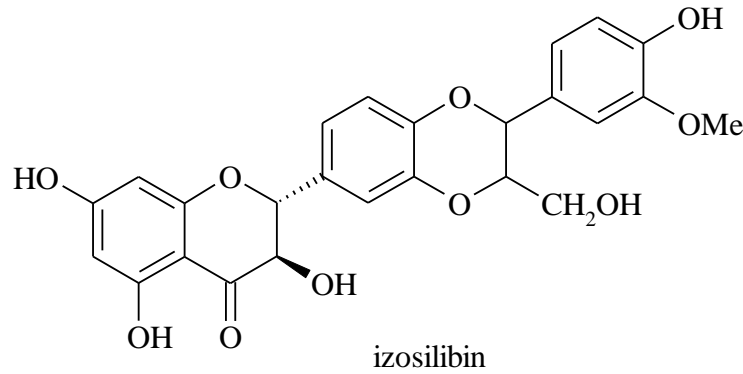
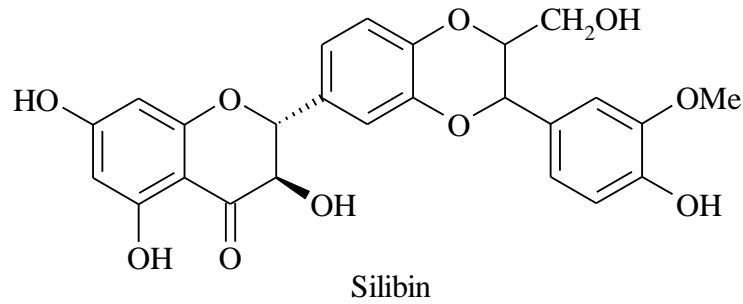


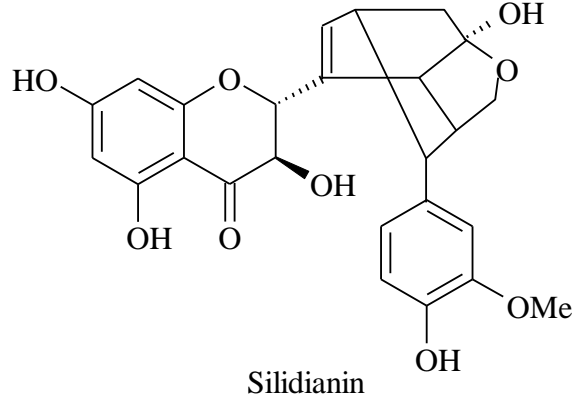
Son zamanlarda bitkilerde bulunan polifenoller / flavonoidler doğal antioksidant olarak araştırmacılar arasında çok ilgi görmüştür. Bitki fenolikleri serbest-radikal söndürücüler veya temel antioksidantlar olarak davranan bileşiklerin başlıca gruplarından birini oluşturur. Aynı genel yapıyı paylaşan fenolikler aromatik hidroksil çekirdeğinden oluşurlar ve içerdikleri bu hidroksil gruplarından dolayı radikal söndürücü özelliği olan çok önemli bitki bileşenleridir (Karaman ve ark. 2009, Öztürk ve ark. 2011). Folin-Ciocalteu indirgeme kapasite analizi (FCR) sıklıkla bitkilerdeki toplam fenolik bileşikleri belirlemek için kullanılır (Gülçin ve ark. 2003a, Oktay ve ark. 2003). Gıdalardaki toplam fenolik bileşenler alkalın ortamındaki fenolik bileşenlerden elektronların transferiyle Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesine göre değerlendirilir ve metot kolaylıkla ve yaygın bir şekilde kullanılır (Singleton ve Rossi 1965, Cai ve ark. 2004; Song ve ark. 2010). FCR'nin tam kimyasal doğası bilinmemektedir, fakat fosfomolibdik/fosfotungstik asit komplekslerini içerdiği kabul edilmektedir (Singleton ve Rossi 1965). Fenolikler bazik ortamda $O_2^{\cdot-}$ 'nin oluşumuyla sonuçlanan sırasıyla tersinir olan bir veya iki elektron transfer reaksiyonu ile enerjistik olarak yükseltgenirler ve fenolikler 750 nm'ye yakın çok yoğun bir absorbansa sahip olan $(P-MoW_{11}O_{40})^{4-}$ mavi kompleksleri oluştururlar (reaksiyon 6-7). Oluşan mavi kompleksler fenolik bileşiklerin yapısından bağımsızdır (Singleton ve ark. 1999, Gülçin ve ark. 2004c, Elmastaş ve ark. 2006a). Ayrıca FCR ayırıcı çoğu fenolik olmayan bileşiklerle (örneğin vitamin C, Cu(I) gibi) indirgenebildiği için fenolik bileşiklere spesifik değildir.



Genellikle *S. marianum*'un tohum ekstraktı toplam silmarin olarak ifade edilir (Quaglia ve ark. 1999). Silmarin; silikristin, izosilikristin, silidianin, silibin A ve B, izosilibin A ve B'yi içeren bazı flavonolignanları, flavonoidleri, %20-30 oranındaki yağ asitlerini ve diğer polifenollerini içerir (Kvasnicka ve ark. 2003).

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg/ml'lik çözeltisinin içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteus yöntemine göre 310 ± 4.93 μg gallik aside eşdeğer olarak bulundu (Çizelge 4.1). Bulunan bu değer *S. marianum* ekstraktının içerdiği fenolik bileşen miktarının yüksek olduğu ve ekstraktın antioksidant aktiviteye sahip olduğunu gösterir. Çünkü Silmarin'in şekil 5.1'deki yapıları dikkate alındığında içerdiği aromatik hidroksil gruplarından dolayı radikal södürücü özelliğe sahiptir.



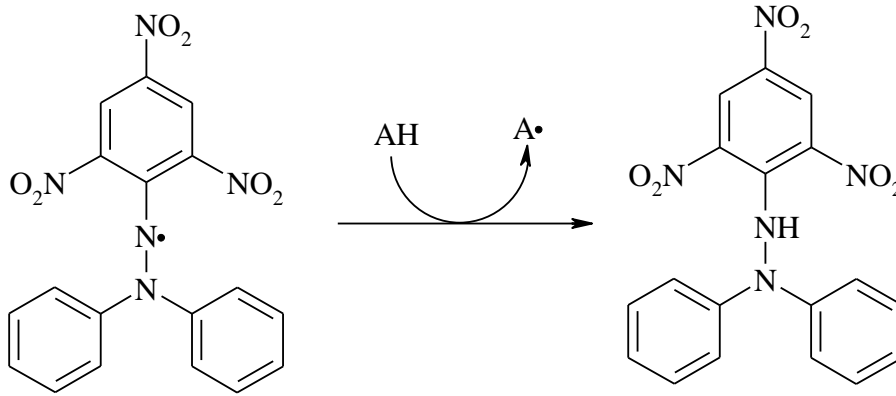


Şekil 5.1. Silmarin bileşenlerinin temel yapısı

Emen ve ark. (2009) *C. niveum* bitkisi ile yaptıkları antioksidant aktivite çalışmasında bu bitkinin (1 mg/ml) metanol ekstraktının toplam fenolik bileşen miktarının 200.9 ± 35.0 μg gallik aside eşdeğer olduğunu tespit etmişlerdir. Konsantrasyon ve elde edilen değer dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının fenolik bileşen miktarının *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktından daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.

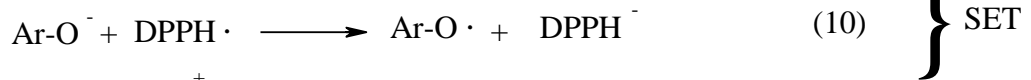
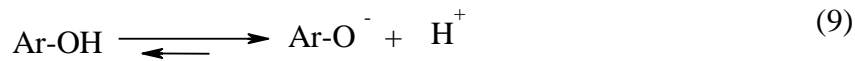
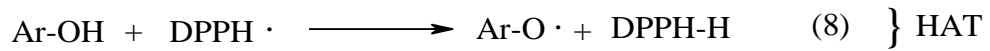
S. marianum tohumunun etanol ekstraktının 0.5 mg/ml'lik çözeltilisinin içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı 19.66 ± 0.11 μg quercetine eşdeğer olarak bulundu (Çizelge 4.2). Yine bulunan bu değer *S. marianum* ekstraktının içerdiği flavonoid bileşen miktarının yüksek olduğunu gösterir. Çünkü *S. marianum*'un doğal yapısında flavonoidler mevcuttur.

DPPH radikali söndürme analizi antioksidant aktiviteyi belirleyen en eski indirekt metottur. DPPH radikali 517 nm'de maksimum bir absorbans gösteren koyu mor renk taşıyan birkaç kararlı organik azot radikallerinden biridir. DPPH radikalleri antioksidant gibi bir proton verici substratla karşılaştıkları zaman radikaller söndürülür ve absorbans düşer (Blois 1958, Gülçin ve ark. 2009). Şekil 5.2'de gösterildiği gibi bu analizde mor kromojen radikal (DPPH \cdot) uçuk sarı hidrazine (DPPH-H) karşılık radikal söndürücü bileşiklerle indirgenir (Blois 1958, Elmastas ve ark. 2006b).



Şekil 5.2. DPPH radikalinin indirgenmesi

DPPH ve fenoller arasındaki reaksiyonun iki farklı mekanizma, direkt HAT (reaksiyon 8) veya SET mekanizmaları (reaksiyon 9-11), boyunca ilerlediği kabul edilir (Foti ve ark. 2004 a, b, Musialik ve Litwinienko 2005).



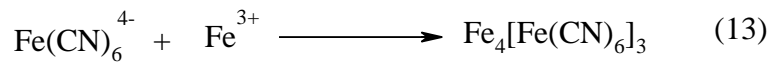
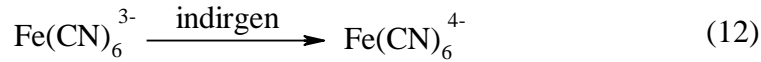
DPPH ve fenoller arasındaki reaksiyonun mekanizması bir elektron transferi (SET) reaksiyonuna bağlı iken hidrojen atomu transferiyle (HAT) gerçekleştirilen reaksiyon marjinal bir reaksiyon yoludur. Çünkü; metanol ve etanol gibi güçlü hidrojen bağının var olduğu çözücülerde reaksiyon çok yavaş bir şekilde meydana gelir (Foti ve ark. 2004 a, b). Ayrıca çözücüde bulunan beklenmedik asitler ve bazlar fenollerin iyonizasyon eşitliğini önemli ölçüde etkiler. Diğer elektron transferine dayanan analizlerde meydana geldiği gibi DPPH radikaline karşı söndürme kapasitesi çözücü ve reaksiyonun pH'ı ile önemli ölçüde etkilenir (Magalhaes ve ark. 2008). Ayrıca DPPH radikalinin sterik erişilebilirliği reaksiyonun ana belirleyicisidir. Çünkü, radikal bölgesine erişmenin daha kolay olduğu küçük moleküller nispeten daha yüksek antioksidant kapasiteye sahip olurlar (Huang ve ark. 2005). Diğer birçok büyük antioksidant bileşik bu analizde yavaş bir şekilde veya etkisiz olarak reaksiyona girebilir.

Antioksidant molekülleri elektron vermeye veya hidrojen atomları sağlamayla DPPH serbest radikallerini söndürebilir; olası serbest radikal yoluyla DPPH molekülüne antioksidant moleküller saldırır ve onları renksiz ve solgun ürünlere dönüştürür. Bu analizde DPPH'in başlangıç absorbansı potansiyel antioksidant eklenir eklenmez ölçülür. Absorbansın düşmesi antioksidantın etkisinden dolayı serbest DPPH'in bir ölçüsüdür (Gülçin ve ark. 2007b, Samadi ve ark. 2011). Sonuçlar genellikle etkin konsantrasyon (EC_{50}) olarak rapor edilir. EC_{50} değeri başlangıçtaki DPPH· radikal konsantrasyonunun % 50'sini azaltmak için gerekli olan antioksidant miktarıdır (Brand-Williams ve ark. 1995). Daha düşük EC_{50} daha yüksek radikal söndürme etkinliği gösterir. EC_{50} 'yi belirlemenin temel sınırı DPPH· radikalinin başlangıç konsantrasyonuna bağlı olan söndürülmüş radikalın yüzdesidir (Magalhaes ve ark. 2008).

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesi 5-150 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. En yüksek aktiviteye 150 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ulaşıldı. Bu konsantrasyonda (150 $\mu\text{g/ml}$) *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktı % 91.95 ± 5.20 DPPH radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve BHA 150 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda sırasıyla % 87.98 ± 5.66 ve % 87.85 ± 2.09 DPPH radikalini söndürme aktivitesi gösterdiler (Çizelge 4.3). Ekstraktın elde edilen DPPH radikalini söndürme aktivitesini pozitif kontrollerle kıyasladığımızda pozitif kontrollerden biraz daha yüksek aktiviteye sahip olduğu sonucuna varıldı.

Emen ve ark. (2009) *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesini 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda % 90 ± 1.2 olarak bulmuşlardır. Çalışılan konsantrasyonlar ve elde edilen değerler dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesinin *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktından daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.

Biyoaktif bileşikler veya besinsel bileşenlerin indirgeme gücü elektron verme kapasitesini yansıtır ve antioksidant aktiviteyle ilişkilidir. Antioksidant etkilerle biyoaktif bileşikler oksidantları indirgeyebilir ve inaktive edebilir (Köksal ve Gülçin 2008). Biyoaktif bir bileşiğin indirgeme kapasitesi $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ 'nin doğrudan $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ 'ye indirgenmesiyle ölçülebilir (reaksiyon 12). İndirgenmiş ürüne serbest Fe^{3+} 'ün eklenmesiyle 700 nm'de güçlü bir absorbansa sahip olan yoğun Perl's Prussian mavi kompleksi $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ elde edilir (reaksiyon 13).



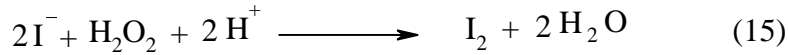
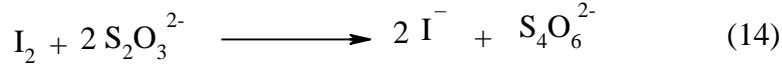
Reaksiyon karışımının absorbansındaki bir artış kompleksin oluşumundaki bir artıştan dolayı indirgeme kapasitesindeki bir artışı gösterir. Bu analizde test çözeltisinin sarı rengi antioksidant örneklerinin indirgeme gücüne bağlı olarak mavi ve yeşilin çeşitli tonlarına dönüşür (Gülçin ve ark 2002a). Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi onun olası antioksidant aktivitesinin önemli bir indikatörü olarak görülür (Gülçin ve ark. 2010c).

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının indirgeme gücü aktivitesi incelenirken 5-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyon aralığında çalışıldı. Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanıldı. Ekstraktın ve pozitif kontrollerin indirgeme potansiyelinin konsantrasyon artışıyla birlikte arttığı gözlemlendi. Ancak pozitif kontrollerin ekstraktan daha güçlü indirgeme potansiyeline sahip olduğu görüldü (Çizelge 4.4). Ekstrakt ve pozitif kontroller arasında $\text{BHA} > \text{BHT} > \text{S. marianum}$ tohumunun etanol ekstraktı sıralamasıyla indirgeme potansiyeli izlendi. Aynı şekilde Emen ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının ve standart bileşiklerin indirgeme potansiyelleri arasında $\text{BHT} > \alpha\text{-tooferol} > \text{C. niveum}$ 'un metanol ekstraktı sırasını gözlemişlerdir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) oksijen metabolizmasıyla üretildiği için organizmalarda doğal bir şekilde var olabilir. Hemen hemen her canlı H_2O_2 'in düşük konsantrasyonlarını zararsız ve katalitik olarak suya ve oksijene ayrıştıran peroksidaz olarak bilinen enzimlere sahiptir. Biyolojik sistemler H_2O_2 üretebilir (Gülçin ve ark. 2003c). H_2O_2 membranlara kolaylıkla geçebilir fakat H_2O_2 düşük konsantrasyonlarda reaktif değildir ve çoğu bileşiklerle tamamen yavaş bir şekilde reaksiyona girer. Ancak

bazen H₂O₂'in *in vitro* hücre ölümünü başlattığı ve hücrelerde toksik olduğu bilinir, çünkü H₂O₂ hücre içinde hidroksil radikaline yol açabilir. H₂O₂'in toksisitesi onun hidroksil radikaline ($\cdot\text{OH}$) dönüşmesinden kaynaklanır (Gülçin ve ark. 2003c).

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂ söndürme aktivitesi titrimetrik olarak incelendi. İncelenen bu metotta KI, Na₂S₂O₃ ile reaksiyonundan 2 e⁻ alarak indirgenir (reaksiyon 14). Oluşan I⁻ anyonu asidik ortamda H₂O₂ ile reaksiyona girer ve indirgeyici olarak davranır (reaksiyon 15). Ancak H₂O₂ ile asidik ortamda I⁻ reaksiyonu oldukça yavaş gerçekleşir. Asit konsantrasyonunun artmasıyla bu reaksiyon daha hızlı gerçekleştiğinden çözelti ortamına amonyum molibdat ilave edilir. Herhangi bir H₂O₂ söndürücü veya bir antioksidant reaksiyon ortamına eklenirse bunlar H₂O₂'i söndürmek için I⁻ ile yarışır. Uygulanan bu metotta askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ekstraktın ve pozitif kontrolün 2.5 mg/ml'lik tek konsantrasyondaki çözeltileri kullanılarak titrasyonla H₂O₂ söndürme aktiviteleri gözlemlendi. Çalışılan konsantrasyonda *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının H₂O₂ söndürme aktivitesi % 57.1±0.04 olarak bulunurken pozitif kontrol olan askorbik asidin H₂O₂ söndürme aktivitesi % 60.5±0.01 olarak bulundu (Çizelge 4.5). Elde edilen bu değerler dikkate alındığında askorbik asidin H₂O₂ söndürme aktivitesinin ekstraktın H₂O₂ söndürme aktivitesinden biraz daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.



Proteinler, hücre ve dokunun önemli elemanlarıdır. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerine (RNS) (örneğin $\cdot\text{OH}$, HOCl ve ONOO⁻) karşı korunmasızdırlar. Protein oksidasyonunun belirlenmesi için en yaygın metot bir hidrazon kromoforla 2,4-dinitrofenil hidrazinin reaksiyonuyla protein oksidasyonunun kararlı bir ürünü olan karbonil grubunun sınırlarını değerlendirmektir.

Proteinlerdeki yapısal değişimlere yol açan temel moleküler mekanizmalar karbonil oluşumuyla karakterize edilen serbest radikal aracılı protein oksidasyonudur. Aslında, karbonil oluşumunun ölçülmesi proteinlerin oksidatif hasarı için hassas bir analiz olarak kullanılmaktadır (Reznick ve Pocker 1994).

FeCl₃/H₂O₂/askorbik asit karışımı fosfat tamponundaki bovin serum albümin (BSA) proteini ile inkübe edildiği zaman üretilen hidroksil radikalleri BSA'ya saldırır.

BSA'nın hidroksil radikalleriyle oksidasyonu peptit bağlarının yıkılması sonucu karbonil oluşumu belirlenir. Hidroksil radikalleriyle ($\cdot\text{OH}$) ile başlatılmış olan albuminin (BSA) oksidatif hasarı üzerinde BHT ve *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının önleyici etkisi şekil 4.6'da gösterilmiştir. BHT'nin, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+3}$ /askorbik asit sistemiyle başlatılan ve karbonil grubunun oluşumuyla sonuçlanan albümin oksidasyonunu konsantrasyon artışına bağlı olarak düşürdüğü ve *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının sırasıyla 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ekstrakt konsantrasyonlarında % 9.16, 9.46, 11.36, 21.10, 42.75 ve 86.27 ile karbonil oluşumu üzerinde konsantrasyona bağlı olarak önleyici etkiyi gösterdiği gözlemlendi (Çizelge 4.6). Hem BHT'nin hem de *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik tespit edildi. Ancak bu konsantrasyonda *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktı ve BHT'nin önleme etkileri arasında önemli bir farklılık bulundu. *S. marianum* ile protein oksidasyonunun önlenmesi serbest radikalleri üreten Fe^{+2} /askorbat üzerinde söndürücü etkisiyle sonuçlandı.

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+3}$ /askorbik asidinin proteinler üzerindeki atağına karşı koruyucu özelliği elektroforetik olarak da incelendi. Bu yöntemde de bovine serum albümin (BSA) protein olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak BHT kullanıldı. Bu metotta da hem BHT hem de *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının konsantrasyon artışına bağlı olarak BSA'yı oksidatif hasardan koruyucu aktivite gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.8A, B ve Şekil 4.9A, B).

Emen ve ark. (2009) *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının Bovin Serum Albumin (BSA) üzerinde hidroksil radikalleriyle başlatılmış olan oksidatif hasarı önleme aktivitesini incelemişlerdir. *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının sırasıyla 25, 50, 100 ve 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda % 6.60, 13.00, 21.00 ve 38.00 ile karbonil oluşumu üzerinde konsantrasyona bağlı olarak önleyici etki gösterdiğini gözlemlenmişlerdir. Konsantrasyonlar ve yüzdeler arasındaki farklılıklar dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının BSA üzerinde hidroksil radikalleriyle başlatılmış olan oksidatif hasarı önleme aktivitesinin *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktından daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.

Kızıl ve ark. (2009) *Hypericum scabroides* (HS) ve *Hypericum triquetrifolium* (HT) bitkilerinin etanol ekstraktlarının Bovin Serum Albumin (BSA) üzerinde hidroksil

radikalleriyle başlatılmış olan oksidatif hasarı önleme aktivitesini incelemişlerdir. HS ve HT bitkilerinin etanol ekstraktlarının 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda sırasıyla % 46±2.8 ve % 48±1.5 ile karbonil oluşumu üzerinde konsantrasyona bağlı olarak önleyici etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu konsantrasyonda (1000 µg/ml) elde edilen değerler karşılaştırıldığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının BSA üzerinde hidroksil radikalleriyle başlatılmış olan oksidatif hasarı önleme aktivitesinin HS ve HT bitkilerinin etanol ekstraktlarından daha yüksek olduğu sonucuna varıldı.

Metalle başlatılan oksijen radikallerinin üretiminin hücre çekirdeğindeki yalnızca DNA'ya saldırmadığı ayrıca oksidasyona aşırı duyarlı olan fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asidi gibi diğer hücresel elemanlara da saldırdığı bilinir (Esterbauer ve ark. 1991, Mamett 1999). Doymamış yağ asidi oksidasyonun başlangıç ürünü olan lipid hidroperoksidaz kısa ömürlüdür dolayısıyla metallerle reaksiyona girdiği zaman kendiliğinden reaktif olan (aldeditler ve epoksitler) çok sayıda ürün meydana getirirler. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun başlıca aldehit ürünlerinden biridir. Malondialdehit memeli hücrelerinde mutajeniktir ve sıçanlarda karsinojeniktir (Valko ve ark. 2004).

S. marianum tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktivitesi sıçan karaciğer homojenatında demir (Fe²⁺) ile başlatılmış olan lipid peroksidasyonunu önlemede tohum ekstraktının farklı konsantrasyonlarının kapasitesi niceleştirilerek değerlendirildi. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi tiyobarbitürik asit (TBA) metoduna göre belirlendi. Pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) kullanıldı. Bu metotta 5-250 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının ve BHT'nin 250 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla % 26.14±0.72 ve % 31.40±0.63 ile en yüksek lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi gösterdiği tespit edildi. Çalışılan tüm konsantrasyonlar dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktı ve BHT arasında önemli bir farklılık bulunmadığı ve her ikisinin de düşük lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesi gösterdiği gözlemlendi.

Emen ve ark. (2009) *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesini sıçan beyni homojenatı üzerinde *in vitro* olarak

araştırmışlardır. 2 mg/ml'lik konsantrasyonda *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu önleme aktivitesini % 84.9 olarak bulmuşlardır.

ROS ile başlatılmış DNA hasarı hem yapısal hem de kimyasal olarak tanımlanabilir ve modifikasyonun karakteristik bir örneğini gösterir. Çeşitli kanser dokularında serbest radikal aracılı DNA hasarı iyi bilinir (Valko ve ark. 2001). Tüm bazların modifikasyonu, bazik-serbest alanların üretilmesi, silinmeler, iskeletin kayması, zincir kırılmaları, DNA-protein çapraz bağları ve kromozal yeniden düzenlemeyi içeren ROS'la gerçekleşen bu değişimlerin büyük çoğunluğu deneysel olarak yeniden yapılabilir. Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikalının üretilmesini kapsayan DNA hasarı önemlidir (Brezova ve ark. 2003). Deroksiriboz omurgası ile birlikte pürin ve pirimidin bazları gibi DNA molekülünün tüm bileşikleri ile hidroksil radikalının reaksiyona girdiği bilinir (Valko ve ark. 2004). DNA UV ile ışınlandığı ve H₂O₂'e maruz kaldığında, H₂O₂ hidroksil radikallerini üretecektir ve DNA'nın süper coiled formu (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, form I) bölünecektir.

Plazmit DNA Qiagene miniprep kitiyle izole edildi. Şekil 4. 10 (A) ve 4. 11 (A)'de Süpercoiled-DNA (form I) ve Open circular-DNA (form II) için niceleştirilmiş bant yoğunluğu gösterilmiştir. Şekil 4. 10 (B) *S. marianum* tohumunun farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstraktının, Şekil 4. 11 (B) *S. marianum* tohum yağının farklı konsantrasyonlardaki petrol eteri ekstraktının supercoiled DNA'yı H₂O₂ fotolizi sonucu oluşan hidroksil radikale karşı koruyucu etkilerinin elektroforetik örneğini göstermektedir.

Daha hızlı hareket eden bant supercoiled DNA'nın doğal formuna karşılık gelir, 1. kuyucukta çift bant şeklinde gösterilir ve daha yavaş hareket eden bant open circular (oc DNA) formuna karşılık gelir. H₂O₂'in varlığında DNA'nın UV ışınlanması (4. kuyucuk), H₂O₂'in UV fotolizinden elde edilen hidroksil radikalının DNA üzerindeki zincir kesimi etkisiyle, sc DNA'nın (form I) oc DNA'ya (form II) bölünmesiyle sonuçlandı. Reaksiyon karışımına ekstraktın eklenmesi (kuyucuk 5-9) oc DNA'nın oluşmasını engelledi ve sc DNA'nın kısmi bir yeniden kazanımı sağlandı. DNA'nın H₂O₂ fotolizi sonucu supercoiled formun hemen hemen tamamının open circular forma dönüştüğü tespit edildi. *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının ve *S. marianum*

tohum yağının net kesimi önleme yüzdeleri 1000 µg/ml'lik konsantrasyonda sırasıyla % 87.80 ve % 35.07 olarak bulundu.

Emen ve ark. (2009) *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisini DNA Agaroz Jel Elektroforeziyle incelemişlerdir. *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktının hidroksil radikalleri sonucu oluşan net DNA kesimini önleme yüzdesini 500 µg/ml konsantrasyonda % 83.94 olarak bulmuşlardır. Konsantrasyonlar ve yüzdeler arasındaki farklılıklar dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının hidroksil radikalleri sonucu oluşan DNA kesimini önleme aktivitesinin *C. niveum* bitkisinin metanol ekstraktından daha düşük olduğu sonucuna varıldı.

Kızıl ve ark. (2009) *Hypericum scabroides* (HS) ve *Hypericum triquetrifolium* (HT) bitkilerinin etanol ekstraktlarının DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisini DNA Agaroz Jel Elektroforeziyle incemişlerdir. HS ve HT bitkilerinin etanol ekstraktlarının hidroksil radikalleri sonucu oluşan net DNA kesimini önleme yüzdelerini 400 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla % 97.00±2.6 ve % 95.61±2.6 olarak bulmuşlardır. Konsantrasyonlar ve yüzdeler arasındaki farklılıklar dikkate alındığında *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının hidroksil radikalleri sonucu oluşan DNA kesimini önleme aktivitesinin HS ve HT bitkilerinin etanol ekstraktlarından daha düşük olduğu sonucuna varıldı.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *S. marianum* tohumunun etanol ekstraktının antioksidant aktivite testlerinde pozitif kontrollerle kıyaslanabilecek derecede antioksidant aktivite gösterdiği ve radikal söndürücü özelliğinin olduğu tespit edildi. Tohum ekstraktının Bovine Serum Albumin (BSA) oksidasyonunu (50-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında) önlediği tespit edilmiştir. Ayrıca ekstraktın DNA oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar bu bitki materyalinin özellikle tohumunun farklı hastalıklar için antioksidant kaynağı olarak kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

- Aktay, G. , Delhorman, D. , Ergun, E. , Ergun, F. , Yeşilada, E. , Çevik, C. 2000. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *J. of Ethnopharm*, 73: 121-129.
- ArasHisar, Ş. , Hisar, O. , Beydemir, Ş. , Gülçin, İ. , Yanık, T. 2004. Effect of vitamin E on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes in vitro and in vivo. *Acta Vet Hung*, 52: 413-422.
- Attaguile, G. , Russo, A. , Campisi, F. , Savoca, F. , Acquaviva, R. , Ragusa, N. , Vanella, A. 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus ancanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol Toxicol*, 16: 83 – 90.
- Aruoma, OI. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 62: 671-683.
- Başer, KHC. 1990. Tıbbi Bitkiler ve Baharatların Dünya’da ve Türkiye’deki Ticareti ve Talep Durumu, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Dergisi*, 53: 18-21.
- Baytop, T. 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniv. Yay. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, No. 40, İstanbul, 240-376.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi-Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Basımevi: İstanbul s.: 198.
- Beckman, JS. 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxy nitrite. *Chem Res Toxicol*, 9: 836-844.
- Bendich, A. , Machlin, LJ. , Scandurra, O. , Burton, GW. , Wayner, DDM. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Bio Med*, 2: 419-444.
- Blois, M.S. 1958. *Nature*. 26: 1199-1200.
- Bocco, A. , Cuvelier, ME. , Richard, H. , Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem*, 46: 2123-2129.
- Bors, W. , Heler, W. , Michel, C. , Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186: 343-355.
- Brand-Williams, W. , Cuvelier, ME. , Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wissen Technol*, 28: 25-30.

Braugher, JM. , Chase, RL. , Pregenzer, JF. 1987. *Biochimica et Biophysica Acta-Elsevier*, 921(3) : 457-464.

Brezova, V. , Valko, M. , Breza, M. , Morris, H. , Telser, J. , Dvoranova, D. , Kaiserova, K. , Varecka, L. , Mazur, M. , Leibfritz, D. 2003. Role of radicals and singlet oxygen in photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug camptothecin: An electron paramagnetic resonance study. *J Phys Chem B*, 107: 2415-2425.

Brigelius-Flohé, R. , Traber, MG. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 13: 1145–1155.

Burton, GW. , 1989. *Journal of Nutrition*, 119 (1): 109-111.

Cai, YZ. , Luo, Q. , Sun, M. , Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74: 2157–2184.

Chen, JH. , Ho, CT. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem*, 45: 2374–2378.

Chimi, H. , Cillard, J. , Cillard, P. , Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 68: 307–312.

Cuppert, S. , Schnepf, M. , Hall, C. 1997. Natural antioxidant-are they a reality? Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. *AOCS Press*, Champaign

Cuvelier, ME. , Richard, H. , Berst, C. 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci Biotech Biochem*, 56: 324–325.

Cooke, MS. , Evans, MD. , Dizdaroğlu, M. , Lunec, J. 2003. *FASEB Journal*, 17: 1195-1214.

Çoban, TA. , Beydemir, Ş. , Gülçin, İ. , Ekinci, D. 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull*, 30: 2257–2261.

Dalle-Donne, I. , Guistraini, D. , Colombo, R. , Rossi, R. , Milzani, A. 2003. Trends in Molecular Medicine-*Elsevier*, 9 :169-176.

Di Mascio, P. , Kaiser, S. , Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 274: 532–538.

Dinis, TCP. , Madeira, VMC. , Almedia, LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 315: 161–169.

Diplock, AT. , Charleux, JL. , Crozier-Willi, G. , Kok, FJ. , Rice-Evans, C. , Roberfroid, M. , Stahl, W. , Vina-Ribes, J. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit J Nut*, 80: 77–112.

Dragsted, LO. , Strube, M. , Leth, T. 1997. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *Eur J Cancer Prev*, 6: 522–528.

Eberhardt, MV. , Lee, CY. , Liu, RH. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405: 903–904.

Elmastaş, M. , Gülçin, İ. , Beydemir, S. , Küfrevioğlu, Öİ. , Aboul-Enein HY. 2006 A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) seeds extracts. *Anal Lett*, 39: 47–65.

Elmastaş, M. , Gülçin, İ. , Işıldak, Ö. , Küfrevioğlu, Öİ. , İbaoğlu, K. , Aboul- Enein, HY. 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *J Iran Chem Soc*, 3: 258–266.

Elmastaş, M. , Türkekul, İ. , Öztürk, L. , Gülçin, İ. , Işıldak, Ö. , Aboul-Enein, HY. 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Comb Chem High T Scr*, 9: 443-448.

Emen, S. , Çeken, B. , Kızıl, G. , Kızıl, M. 2009. DNA damage protecting avtivity and in vitro antioxidant potential of methanol extract of *Cyclotrichium niveum*. *Pharmaceutical Biology*, 47 (3): 219-229.

Esterbauer, H. , Gebicki, J. , Puhl, H. , Jurgens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med*, 13: 341–390.

Etminan, M. , Gill, SS. , Sami, A. 2005. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a metaanalysis. *Lancet Neurol*, 4: 362–365.

Elzaawely, AA. , Xuan, TD. , Tawata, S. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* HOUTT. aerial parts. *Biol. Pharm. Bull*, 28: 2225–2230.

Esterbauer, H. , Schaur, RJ. , Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxydesoxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* , 11: 81-128.

Evans, MD. , Cooke, MS. 2004. *BioEssays*, 26: 533-542.

Foti, MC. , Daquino, C. , Geraci, C. 2004a. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *J Org Chem*, 69: 5888-5896.

Foti, MC. , Daquino, C. , Geraci, C. 2004b. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. *J Org Chem*, 69: 2309-2314.

Fukuhara, K. , Miyata, N. 1998. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. *Bioorg Med Chem Lett*, 8: 3187-3192.

Ganesan, K. , Kumar, KS. , Rao, PVS. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innov Food Sci Emerg*, 12: 73–78.

García-Parrilla, MC. 2008. Antioxidantes en la dieta mediterránea. *Nutrición Clínica en Medicina* 3: 129 – 140.

Godbout, JP. , Berg, BM. , Kelley, KW. , Johnson, RW. 2004. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *J Neuroimmunol*, 149: 101–109.

Gromadzinska, J. , Wasowicz, W. , Rydzynski, K. , Szeszenia-Dabrowska, N. 2003. *Biological Trace Element Research*, 91 (3) : 203–215.

Gülçin, İ. , Büyükkuroğlu, ME. , Oktay, M. , Küfrevioğlu, Öİ. 2002a. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. *J Pineal Res*, 33: 167–171.

Gülçin, İ. , Büyükkuroğlu, ME. , Küfrevioğlu, Öİ. 2003a. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res*, 34: 278–281.

Gülçin, İ. , Oktay, M. , Kireççi, E. , Küfrevioğlu, Öİ. 2003c. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem*, 83: 371–382.

Gülçin, İ. , Mshvildadze, V. , Gepdiremen, A. , Elias, R. 2004c. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Med*, 70: 561–563.

Gülçin, İ. , Berashvili D. , Gepdiremen A. 2005a. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *J Ethnopharmacol*, 101: 287–293.

Gülçin, İ. 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32: 431–438.

Gülçin, İ. , Elmastas, M. , Aboul-Enein, HY. 2007b. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytother Res*, 21: 354-361.

Gülçin, İ. , Elias, R. , Gepdiremen, A. , Taoubi, K. , Köksal, E. 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Sci Technol*, 43: 195-212.

Gülçin, İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: a structureactivity insight. *Innov Food Sci Emerg*, 11: 210–218.

Gülçin, İ. , Bursal, E. , Şehitoğlu, HM. , Bilsel, M. , Gören, AC. 2010a. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol*, 48: 2227–2238.

Gülçin, İ. , Huyut, Z. , Elmastaş, M. , Aboul-Enein, HY. 2010c. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab Chem*, 3: 43–53.

Gülçin, İ. , Topal, F. , Çakmakçı, R. , Gören, AC. , Bilsel, M. , Erdoğan, U. 2011a. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *J Food Sci*, 76: C585–C593.

Gülçin, İ. , Topal, F. , Oztürk Sarıkaya, SB. , Bursal, E. , Gören, AC. , Bilsel, M. 2011b. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Rec Nat Prod*, 5: 158–175.

Gümüşçü, A. , Arslan, N. , Gürbüz, B. 1998. Farklı ekim zamanlarının meryemana dikenini (*S. marianum*)’nin verim ve bazı özelliklerine etkisi, Proceedings of XIIth International Symposium on Plant Originated Crude Drugs, Ankara. 106.

Halliwell, B. , Gutteridge, JMC. , Auroma, OI. 1987. The deoxyribose method: A simple “test tube” assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 165: 215 - 219.

Halliwell, B. , Gutteridge, JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B. , Gutteridge, JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol*, 186: 1–85.

Halliwell, B. , Gutteridge, JMC. , Cross, CE. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* , 119: 598 - 620.

Halliwell, B. 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 49: 1341–1348.

Halliwell, B. 1997. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nut*, 16: 33–50.

Halliwell, B. , Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Pres. Inc, London 1999.

Harborne, JB. , Baxter, H. , Moss GP. 1999. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edn. Taylor and Francis, London

Heim, KE. , Taigliaferro, AR. , Bobilya, DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* ., 13: 572-584.

Hou, YC. , Janczuk, A. , Wang, PG. 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des*, 5: 417–441.

Huang, D. , Ou, B. , Prior, RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53: 1841–1856.

Innocenti, A. , Gülçin, İ. , Scozzafava, A. , Supuran, CT. 2010a. Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenol natural products effectively inhibit mammalian isoforms I-XV. *Bioorg Med Chem Lett*, 20 :5050–5053.

Innocenti, A. , Öztürk Sarıkaya, SB. , Gülçin, İ. , Supuran, CT. 2010b. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorg Med Chem*, 18: 2159–2164.

Johnson, EJ. , Hammond, BR. , Yeum, KJ. , Qin, J. , Wang, XD. , Castaneda, C. , Snodderly, DM. , Russell, RM. 2000. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. *Am J Clin Nutr*, 71: 1555–1562.

Jovanovic, SV. , Stenken, S. , Tomic, M. , Marjanovic, B. , Simic, MG. 1994. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*, 116: 4846–4851.

Kahkonen, MP. , Hopia, AI. , Vuorela, HJ. , Rauha, JP. , Pihlaja, K. , Kujala, TS. , Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* , 47: 3954-3962.

- Karaman, S. , Tütem, E. , Başkan, KS. , Apak, R. 2009. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chem*, 120: 1201–1209.
- Kızıl, G. , Kızıl, M. , Çeken, B. 2009. Protective Ability of Ethanol Extracts of *Hypericum scabroides* Robson & Poulter and *Hypericum triquetrifolium* Turra against Protein Oxidation and DNA Damage. *Food Sci. Biotechnol*, 18: 130-136.
- Kızıl, M. , Yılmaz, EI. , Pirinccioğlu, N. , Aytekin, C. 2003. DNA cleavage activity of diazonium salts :Chemical nucleases. *Turk J Chem*, 27: 539-544.
- Köksal, E. , Gülçin, İ. 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turk J Agric For*, 32: 65–78.
- Krishnadev, N. , Meleth, AD. , Chew, EY. 2010. Nutritional supplements for age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*, 21 :184–189.
- Kron, PA. , Williamson, G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J Sci Food Agric*, 79: 355–361.
- Kumar, A. , Chattopadhyay, S. 2007. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chem.* , 100: 1377-1384.
- Kvasnicka, F. , Biba, B. , Sevicik, R. , Voldrich, M. Kratka, J. 2003. Analysis of the active components of silymarin. *J. Chromatog.* , A. 990, 239-245.
- Laemli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lampi, AM. , Piironen, V. 1998. a and c-Tocopherols as efficient antioxidants in butter oil triacylglycerols. *Fett/Lipid*, 100: 292–295.
- Lemanska, K. , Szymusiak, H. , Tyrakowska, B. , Zielinski, R. , Soffer AEMF. , Rietjens, IMCM. 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol Med*, 31: 869–881.
- Lo, KM. , Cheung, CK. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *Alba*. *Food Chem*, 85: 533–539.
- Lorenzo, Y. , Azqueta, A. , Luna, L. , Bonilla, F. , Dominguez, G. , Collins, AR. 2008. The carotenoid b-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis*, 30: 308–314.

MacDonald-Wicks, LK. , Wood, LG. , Garg, ML. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric*, 86: 2046–2056.

MacNee ,W. 2000. M. D. Oxidants/Antioxidants and COPD. *Chestjournal*, 117: 3035–317.

Magalhães, LM. , Segundo, MA. , Reis, S. , Lima, JLFC. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*, 613: 1-19.

Magalhães, LM. , Santos, M. , Segundo, MA. , Reis, S. , Lima, JLFC. 2009. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77: 1559–1566.

Marnett, LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mugag*, 424: 83-95.

Marinova, EM. , Yanishlieva, NV. 1994. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. *J Amer Oil Chem Soc*, 71: 427–434.

Middleton, EJ. , Kandaswami, C. 1993. In the flavonoids advances in research since 1986. In: Harborne JB (ed) Chapman & Hall/CRC, New York.

Milligan, JR. , Ward, JF. , 1994. *Official Journal of the Radiation Research*, 137: 295-299.

Mortensen, A. , Skibsted, LH. 1997. Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *J Agric Food Chem*, 45: 2970–2977.

Musialik, M. , Litwinienko, G. 2005. Scavenging of dpph* radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Org Lett*, 7: 4951–4954.

Oktay, M. , Gülçin, İ, Küfrevioğlu, Öİ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm WissenTechnol*, 36: 263–271.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction : Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J Nutr*, 44: 307–315.

Öztürk Sarıkaya, SB. , Gülçin, İ. , Supuran, CT. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chem Biol Drug Design*, 75: 515–520.

Öztürk Sarıkaya, SB. , Topal, F. , Şentürk, M. , Gülçin, İ. , Supuran, CT. 2011. In vitro inhibition of a-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 4259–4262.

Packer, L. 1996. Nitric oxide. Part A: sources and detection of NO; NO synthase. *Method Enzymol*, 268: 331–340.

Pellegrini, N. , Serafini, M. , Colombi, B. , Del Río, D. , Salvatore, S. , Bianchi, M. , Brighenti, F. 2003 Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nut*, 133: 2812–2819.

Pérez-Jiménez, J. , Saura-Calixto, F. 2005. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J Agric Food Chem*, 53: 5036 – 5040.

Pietta, PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63: 1035–1042.

Pokorny, J. 1987. Major factors affecting the autoxidation of lipids'. In: Chan HWS (ed) Autoxidation of unsaturated lipids. Academic Press, London, pp 141–206.

Pokorny, J. 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan H (ed) Academic Press, London, p 141.

Pokorny, J. 1999. Antioxidants in food preservation'. In: Shafiur Rahman M (ed) Handbook of food preservation. Marcel Dekker, New York, pp 309–337.

Prior, RL. , Wu, XL. , Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 53: 4290–4302.

Quaglia, MG. , Bossu, E. , Donati, E. , Mazzanti, G. , Brandt, A. 1999. Determination of silymarin in the extract from the dried *Silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 19 (3-4), 435 - 442.

Rajeshwar, Y. , Kumar, S. , Gupta, M. , Mazumder, UK. 2005. Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *European Bull Drug Res.* , 13: 31–39.

Reaven, PD. , Witztum, JL. 1996. Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Ann Rev Nut*, 16: 51–71.

Reznick, AZ. , Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 233: 357-363.

Rice-Evans, CA. , Miller NJ. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc T*, 24: 790–795.

Riccioni, G. 2009. Carotenoids and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, 11: 434–439.

Robbins, RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 51: 2866–2887.

Rock, CL. , Jacob, RA. , Bowen, PE. 1996. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc*, 96: 693–702.

Samadi, A. , Soriano, E. , Revuelta, J. , Valderas, C. , Chioua, M. , Garrido, I. , Bartolomé, B. , Tomassolli, I. , Ismaili, L. , González-Lafuente, L. , Villarroya, M. , García, AG. , Oset-Gasque, MJ. , Marco-Contelles, J. 2011. Synthesis, structure, theoretical and experimental in vitro antioxidant/pharmacological properties of a-aryl, N-alkyl nitrones, as potential agents for the treatment of cerebral ischemia. *Bioorg Med Chem* 19: 951–960.

Schreck, R. , Baeuerle, PA. 1994. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-KB. *Method Enzymol*, 234: 151–163.

Sen, CK. , Packer L. 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FEBS Lett*, 10: 709–720.

Sherwin, ER. 1990. In: Branen AL, Davidson PM, Salminen S (eds) Food additives, Marvel Dekker Inc., New York, pp 139–193.

Shimada, K. , Fujikava, K. , Yahara, K. , Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*, 40: 945 – 548.

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 91: 31–39.

Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem*, 215: 213–219.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82: 291–295.

Sies, H. , Stahl, W. 1995. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nut*, 62: 1315–1321.

Singleton, VL. , Rossi, JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144–158.

Singleton, VL. , Orthofer, R. , Lamuela-Raventos, RM. 1999. Analysis of total. phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 15 –178.

Song, FL. , Gan, RY. , Zhang, Y. , Xiao, Q. , Kuang, L. , Li, HB. 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *Int J Mol Sci*, 11: 2362–2372.

Sroka, Z. , Cisowski, W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol*, 41: 753–758.

Stadtman, ER. , Levine, RL. 2003. *Amino Acids Journal*, 25: 207-218.

Stahl, W. , Sies, H. 1993. Physical quenching of singlet-oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Ann NY Acad Sci*, 691: 10–19.

Stahl, W. , Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Asp Med*, 24: 345–351.

Susan, D. , Arnum, V. 1998. Vitamin A in Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. Wiley, New York, pp 99–107.

Şentürk, M. , Gülçin İ. , Beydemir, Ş. , Küfrevioğlu, Öİ. , Supuran, CT. 2011. In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chem Biol Drug Des*, 77: 494-499.

Tanker, M. , Tanker, N. 1998. Farmakognozi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. Ankara s. : 213 - 214.

Tanker, N. , Koyuncu, M. , Coşkun, M. 2004. Farmasotik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. No: 88 : 281, 324 - 325.

Timmermann, TV. 1990. Tocopherole-antioxidative Wirkung bei Fetten und Ö len. *Fat Sci Technol*, 92: 201–206.

Valenzuela, AB. , Nieto, SK. 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47: 186–196.

Valko, M. , Morris, H. , Mazur, M. , Rapta, P. , Bilton, RF. 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta*, 1527: 161-166.

Valko, M. , Mario, Í. , Mazur, M. , Rhodes, CJ. , Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266: 37-56.

Wang, BS. , Lin, SS. , Hsiao, WC. , Fan, JJ. , Fuh, LF. , Duh, PD. 2006. Proctective effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves on oxidative damage of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem*, 98: 149–157.

Weber, P. , Bendich, A. , Schalch, W. 1996. Vitamin C and human healtha review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vit Nut Res*, 66: 19–30.

Wichi, HP. 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol*, 26: 717–723.

Williams, RJ. , Spencer, JP. , Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biol Med*, 36: 838–849.

Wright, JS. , Johnson, ER. , DiLabio, GA. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc*, 123: 1173–1183.

Zhao, GR. , Xiang, ZJ. , Ye, TX. , Yuan, YJ. , Guo, ZX. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, 99: 767–774.

Zhishen, J. , Mengcheng, T. , Jianming, W. 1999. *Food Chemistry* , 64: 555–559.

Zhou, K. , Laux, JJ. , Yu, L. 2004. Comparison of Swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* , 52: 1118–1123.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Aynur SERÇE
Doğum Yeri : Diyarbakır
Doğum Tarihi : 12.07.1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

İlköğretim : Mersin Bahçelievler İÖÖ (1992-2000)

Lise : Mersin Pakize Kokulu Lisesi (2000-2003)

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.(2010-2012)